

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vergleichende Analysen des Proteoms
ausgewählter renaler Neoplasien

von Bianca Herta Heckelmann, geb. Rüb

aus Marktheidenfeld

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Angefertigt am Institut für Klinische Pathologie
des Universitätsklinikums Freiburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Werner

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1	Renale Neoplasien bei Haustieren.....	3
1.1	Epidemiologie und Einteilung.....	3
1.2	Ätiologie.....	3
1.3	Makroskopische und mikroskopische Darstellung epithelialer renaler Neoplasien.....	4
1.4	Makroskopische und mikroskopische Darstellung embryonaler renaler Neoplasien.....	5
1.5	Mikroskopische und makroskopische Darstellung mesenchymaler renaler Neoplasien.....	5
1.6	Klinik	5
1.7	Prognose und Therapiemöglichkeiten	6
2	Renale Neoplasien beim Menschen	7
2.1	Epidemiologie und Einteilung.....	7
2.2	Klarzellige Nierenzellkarzinome	10
2.2.1	Definition.....	10
2.2.2	Ätiologie.....	10
2.2.3	Genetischer Hintergrund.....	10
2.2.4	Klinik.....	10
2.2.5	Makroskopische und mikroskopische Darstellung	11
2.2.6	Prognose.....	12
2.3	Chromophobe Nierenzellkarzinome.....	13
2.3.1	Definition.....	13
2.3.2	Ätiologie.....	13
2.3.3	Genetischer Hintergrund.....	13
2.3.4	Klinik.....	13
2.3.5	Makroskopische und mikroskopische Darstellung	13
2.3.6	Prognose.....	14
2.3.7	Hybridtumoren aus Onkozytom und chromophobem Nierenzellkarzinom.....	15
2.4	Renale Onkozytome	15
2.4.1	Definition.....	15
2.4.2	Ätiologie.....	15
2.4.3	Genetischer Hintergrund.....	15
2.4.4	Klinik.....	15
2.4.5	Makroskopische und mikroskopische Darstellung	16
2.4.6	Onkozytose	16
2.4.7	Prognose.....	17
2.5	Therapiemöglichkeiten.....	17

3	Valosin-enthaltendes Protein	17
4	Unspezifische cytosolische Dipeptidase 2	19
5	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1	19
6	Sorbitol-Dehydrogenase	20
7	Retinol-Dehydrogenase 11	21
8	Integrin alpha-V	21
III	MATERIAL UND METHODEN	23
1	Patientenkollektive	23
1.1	Metastasierende und nicht metastasierende klarzellige Nierenzellkarzinome	23
1.2	Chromophobe Nierenzellkarzinome und renale Onkozytome	26
2	Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse	28
2.1	Mikroskopisch kontrollierte Makrodissektion	30
2.2	Proteinextraktion	30
2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuretest	31
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test	32
2.4	Proteinverdau	32
2.5	Erstellen eines Standards	34
2.6	Isotopisches Markieren	35
2.7	Entsalzung und Fraktionierung	37
2.7.1	Entsalzung mittels Umkehrphasen-Festphasenextraktion	37
2.7.2	Fraktionierung mittels HPLC	38
2.7.3	Fraktionierung mittels StageTips	38
2.7.4	Entsalzung mittels StageTips	39
3	Vermessung der Proben im Massenspektrometer	40
4	Analyse der massenspektrometrischen Daten	40
4.1	Auswertung der Massenspektren mit MaxQuant	40
4.2	Validierung des Standards	41
4.3	Verwendete statistische Testverfahren	42
4.4	Identifizierung angereicherter, biologischer Motive	42

5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Gewebeschnitten.....	43
6	Immunhistochemische Reaktionen an Gewebeschnitten.....	43
6.1	Entparaffinierung.....	43
6.2	Vorbehandlungen zur Antigendemaskierung.....	44
6.3	Antikörperetablierung.....	45
6.4	Färbeprotokoll	48
7	Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen.....	49
7.1	Qualitative Beurteilung.....	49
7.2	Semiquantitative Evaluation	49
7.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ.....	50
7.4	Verwendete statistische Testverfahren.....	51
IV	ERGEBNISSE	53
1	Vergleich metastasierender mit nicht metastasierenden ccRCC.....	53
1.1	Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse.....	53
1.1.1	Identifizierung und Quantifizierung durch MaxQuant.....	53
1.1.2	Validierung des Standards	54
1.1.3	Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression	55
1.1.4	Angereicherte, biologische Motive	58
1.2	Aminopeptidase N	60
1.2.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion	61
1.2.2	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden	62
1.3	Valosin-enthaltendes Protein.....	62
1.3.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion	64
1.3.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen.....	64
1.3.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ	65
1.3.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden	67
1.4	Unspezifische cytosolische Dipeptidase 2	68
1.4.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion	69
1.4.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen.....	70
1.4.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ	70
1.4.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden	71
2	Vergleich zwischen chRCC und RO.....	72
2.1	Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse.....	72
2.1.1	Identifizierung und Quantifizierung durch MaxQuant.....	72
2.1.2	Validierung des Standards	74
2.1.3	Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression	75
2.1.4	Angereicherte, biologische Motive	80

2.2	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1	82
2.2.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.....	83
2.2.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen	84
2.2.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ.....	86
2.2.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden.....	89
2.3	Sorbitol-Dehydrogenase	90
2.3.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.....	91
2.3.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen	92
2.3.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ.....	92
2.3.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden.....	93
2.4	Retinol-Dehydrogenase 11	94
2.4.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.....	95
2.4.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen	96
2.4.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ.....	96
2.4.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden.....	98
2.5	Integrin alpha-V	99
2.5.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.....	100
2.5.2	Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen	101
2.5.3	Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ.....	102
2.5.4	Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden.....	105
V	DISKUSSION	108
1	Verwendete Methoden	108
1.1	Massenspektrometrische Analyse.....	108
1.2	IHC zur Validierung von Ergebnissen aus der Massenspektrometrie.....	109
1.3	Vergleich zwischen semiquantitativer Evaluation und Auswertung mit IHC Profiler .	113
2	Vergleich metastasierender mit nicht metastasierenden ccRCC	115
2.1	Zusammensetzung des Patientenkollektivs	115
2.2	Unterschiede im Proteom	116
2.3	Expression von Valosin-enhaltendem Protein	117
2.4	Expression von unspezifischer cytosolischer Dipeptidase 2.....	118
2.5	Abschließende Beurteilung.....	119
3	Vergleich zwischen chRCC und RO	122
3.1	Zusammensetzung des Patientenkollektivs	122
3.2	Unterschiede im Proteom	123
3.3	Expression von Lysosom-assoziierten Membranprotein 1	125
3.4	Expression von Sorbitol-Dehydrogenase	126
3.5	Expression von Retinol-Dehydrogenase 11	126

3.6	Expression von Integrin alpha-V	127
3.7	Abschließende Beurteilung.....	127
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
VII	SUMMARY	131
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	133
IX	ANHANG	146
1	Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte.....	146
1.1	Bei der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse	146
1.2	Bei der Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten.....	150
2	Zusammensetzung der verwendeten Puffer	153
3	Herstellung der 12,5-prozentigen Polyacrylamidgele	153
4	Zusammensetzung der Reagenzien für die Silbernitratfärbung.....	154
5	Zusammensetzung der Lösungen für die Fraktionierung mittels StageTips.....	154
6	Protokoll für den Coverstainer	155
X	DANKSAGUNG.....	156

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD13	Aminopeptidase N, CD13
chRCC	chromophobes Nierenzellkarzinom
c-kit	Mast-/Stammzellen-Wachstumsfaktor-Rezeptor Kit, Tyrosinkinase Kit, CD117
cm	Zentimeter
CNDP2	unspezifische cytosolische Dipeptidase 2
Da	Dalton
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ep4	epithelial cell adhesion molecule, EpCAM
Fc-Wert	Fold change-Wert
FDR	Rate falscher Identifizierungen
FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet
GTPase	Guanosintriphosphatase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF α	Hypoxie-induzierter Faktor α
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iBAQ	intensitätsbasierte, absolute Quantifizierung
IHC	Immunhistochemie
ISUP	International Society of Urological Pathology
ITGAV	Integrin alpha-V
kDA	Kilodalton
LAMP1	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1
Limma	linear models for microarray data
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μ m	Mikrometer
mTOR	mammalian target of rapamycin
m/V	Verhältnis Gewicht zu Volumen
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
p53	Tumorsuppressorprotein Tp53
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RCC	Renal cell carcinoma marker-gp200
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung

RDH11	Retinol-Dehydrogenase 11
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
RO	renales Onkozytom
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAM	significance analysis of microarrays
sec	Sekunde
SORD	Sorbitol-Dehydrogenase
StageTips	stop-and-go-extraction tips
VCP	Valosin-enthaltendes Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau
VIM	Vimentin
WHO	Weltgesundheitsorganisation

I EINLEITUNG

Die Niere war in Deutschland im Jahr 2012 mit 3,8 % aller Krebsneuerkrankungsfälle beim Mann und mit 2,4 % bei der Frau die sechst- bzw. zehnthäufigste Lokalisation für maligne Tumoren. Im gleichen Jahr sind in Deutschland 3 125 Männer und 2 131 Frauen aufgrund von Nierentumoren gestorben. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015) Mit einem Anteil von 90 % stellt das Nierenzellkarzinom den häufigsten malignen Tumor der Niere im Erwachsenenalter dar. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015) Inzwischen werden Nierenzellkarzinome nicht mehr als eine einheitliche Entität aufgefasst. (DELAHUNT et al., 2013) Hingegen werden verschiedene Subtypen mit differenter Morphologie, Genexpression und Prognose unterschieden. (LINEHAN et al., 2003; AMIN et al., 2008; LINEHAN, 2012; DELAHUNT et al., 2013) Mit etwa 65-70 % aller malignen Nierentumoren überwiegen die klarzelligen Nierenzellkarzinome. Weitere häufige Subtypen sind das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom, die mit einem ungefähren Anteil von 18,5 % bzw. 5-7 % aller Nierenzellkarzinome auftreten. (MOCH et al., 2016)

Für lokal begrenzte Nierenzellkarzinome besteht die empfohlene Therapie in einer Tumoresektion. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015) Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt dann je nach Tumorgröße und lokaler Invasion bei 75-98 %. (TUMORREGISTER MÜNCHEN, 2016) Begrenzt sind die Therapiemöglichkeiten jedoch beim Auftreten von Metastasen. Unter den drei meist verbreiteten Subtypen metastasiert insbesondere das klarzellige Nierenzellkarzinom häufig. (LEIBOVICH et al., 2010; DELAHUNT et al., 2013) Dabei haben etwa 20-30 % der Nierenzellkarzinome bereits bei der Diagnosestellung Metastasen gebildet. Nach einer Therapie bekommen etwa 20-30 % aller Patienten asynchrone Metastasen oder ein lokales Rezidiv. (DABESTANI et al., 2016) Bei der Behandlung metastasierter klarzelliger Nierenzellkarzinome hat die Einführung der zielgerichteten Therapie einen gravierenden Einschnitt gebracht. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015) Dennoch liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei nur 15,5 % für zum Zeitpunkt der Tumoresektion metastasierte bzw. etwa 20 % für Nierenkarzinome, bei denen zu einem späteren Zeitpunkt Fernmetastasen diagnostiziert wurden. (TUMORREGISTER MÜNCHEN, 2016) Um die Überlebenschancen betroffener Patienten zu verbessern, sind daher neue Therapiemöglichkeiten notwendig. Ein besseres Verständnis der bei der Metastasierung des Nierenzellkarzinoms ablaufenden Vorgänge kann hierbei eine gute Basis für die Entwicklung neuer Therapieansätze legen. Des Weiteren sind gute diagnostische und prognostische Biomarker essentiell, um eine Metastasierung frühzeitig zu erkennen und das Patientenmanagement zu verbessern.

Die Prognose bei chromophoben Nierenzellkarzinomen ist hingegen deutlich besser. Über 90 % der Fälle bleiben Metastasen und Rezidiv frei. (AMIN et al., 2008) Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt somit bei 78-100 %. (AMIN et al., 2008; MOCH et al., 2016) Da dennoch ein gewisses Risiko für ein Rezidiv besteht, ist die sichere Diagnose dieses malignen Tumors für die Planung der Patientenüberwachung essentiell. Hierbei stellt insbesondere die Abgrenzung zu den benignen renalen Onkozytomen in Fällen mit nicht ganz eindeutiger Histologie eine besondere Herausforderung an den Pathologen dar. (REUTER et al., 2014; NG et al., 2016) Aus diesem Anlass wurden bereits zahlreiche Biomarker in der Immunhistochemie auf deren Eignung zur Unterscheidung dieser beiden Neoplasien untersucht. Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, hierfür einen robusten und konsistent reproduzierbaren Biomarker zu finden. (NG et al., 2016) Ferner ähneln sich diese beiden Entitäten nicht nur im Hinblick auf ihre Morphologie und deren Expressionsprofil zahlreicher Biomarker, sondern sie weisen auch Gemeinsamkeiten in ihrem

genetischen Expressionsprofil auf. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, dass sie aus der gleichen nicht neoplastischen Zelle entstehen. (HIGGINS et al., 2003; JOSHI et al., 2015) Insofern ist ein Vergleich des malignen chromophoben Nierenzellkarzinoms und des benignen renalen Onkozytoms auch im Hinblick auf die Carcinogenese fördernde Prozesse von Interesse.

Eine Methode, die in den letzten Jahren zunehmend Akzeptanz und Bedeutung in der Krebsforschung gewonnen hat, ist die Massenspektrometrie. (JIMENEZ & VERHEUL, 2014; PARKER & BORCHERS, 2014; ZHOU et al., 2015) Sie ermöglicht unter anderem die quantitative Analyse des Proteoms. Dies bietet zum einen die Möglichkeit der Detektion neuer, potentieller Biomarker, zum anderen kann die Erforschung des Proteoms die verbreiteten Analysen des Genoms sehr gut ergänzen. Schließlich charakterisiert das Proteom das tatsächliche Expressionsprofil und somit den Phänotyp der Zellen. Neben der Identifizierung von Biomarkern kann die Proteomik folglich zur Verbesserung des Verständnisses pathogenetischer Mechanismen beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine massenspektrometrische Analyse genutzt, um die Proteome ausgewählter renaler Neoplasien zu vergleichen. Zur Bestätigung der Ergebnisse folgten immunhistochemische Untersuchungen für einige ausgewählte Proteine. Es wurden zwei Aspekte fokussiert. Zum einen wurden mögliche molekulare Veränderungen im Zusammenhang mit der Metastasierung bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen und zum anderen mögliche molekulare Unterschiede zwischen chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen untersucht. Ziel war es jeweils, potentielle diagnostische und prognostische Biomarker zu identifizieren.

In Kapitel II.1 erfolgt zunächst ein Überblick über bei Haustieren vorkommende renale Neoplasien. Dem schließt sich in Kapitel II.2 eine Ausführung über die beim Menschen vorkommenden renalen Neoplasien an, wobei der Schwerpunkt auf den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Entitäten liegt. In den Kapiteln II.3-II.8 werden die für die Immunhistochemie ausgewählten Proteine vorgestellt. Die verwendeten Methoden sind in den Abschnitten des Kapitel III beschrieben. Die Ergebnisse aus den Analysen der klarzelligen Nierenzellkarzinome werden in Kapitel IV.1 und jene aus dem Vergleich zwischen chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen in Kapitel IV.2 gezeigt. Eine allgemeine Diskussion zu den durchgeführten Analysen erfolgt in Kapitel V.1, während die Ergebnisse der beiden proteomischen Vergleiche in den Kapiteln V.2 und V.3 voneinander getrennt diskutiert werden.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Renale Neoplasien bei Haustieren

1.1 Epidemiologie und Einteilung

Mit einem Anteil von weniger als 1 % an allen erfassten Neoplasien sind primäre Nierentumoren bei Haustieren sehr selten. Die meist einseitig vorkommenden Tumoren können epithelialen, mesenchymalen oder embryonalen Ursprungs sein. Der häufigste primäre Nierentumor ist das Nierenzellkarzinom, welches zu den epithelialen Tumoren zählt und vor allem bei älteren Hunden auftritt. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Ferner kommt dieses auch bei Katzen, Rindern und Pferden vor. (WISE et al., 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Bei jungen Schweinen und Hühnern stellt hingegen das Nephroblastom, ein embryonaler Tumor, den häufigsten primären Nierentumor dar. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015). Weniger häufig kommt dieses auch bei Hundewelpen und Kälbern vor. Ältere Tiere sind hiervon selten betroffen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Mit der Ausnahme von Kühen besteht bei männlichen Haustieren eine Disposition für Nierentumoren. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Dem entsprechend liegt das Männlich-zu-Weiblich-Verhältnis für Nierenzellkarzinome beim Hund bei 1,6-1,8:1. (BRYAN et al., 2006) Abgesehen von einem Zusammenhang zwischen Nierenzellkarzinomen und der nodulären Dermatofibrose beim Deutschen Schäferhund wurden bisher keine Rassedispositionen für renale Neoplasien bei Hunden festgestellt. (BRYAN et al., 2006) Bei Pferden gibt es derzeit keinen Hinweis auf eine Geschlechtsdisposition für Nierenzellkarzinome. Zwar sind unter den knapp 30 publizierten Fällen manche Rassen überrepräsentiert, aufgrund der geringen Fallzahl kann hieraus jedoch nicht auf eine Rassedisposition geschlossen werden. (WISE et al., 2009)

Wesentlich häufiger als primäre Nierentumoren sind in den Nieren von Haustieren Metastasen von malignen Tumoren aus anderen Organen zu finden. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Üblicherweise treten diese multipel und bilateral auf. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Metastasen in der Niere sind bei vielen Tierarten und Tumorarten häufig. Den größten Anteil nehmen dabei solche von Mammakarzinomen bei Hund und Katze sowie von Melanomen und Hä-mangiosarkomen bei Pferd, Hund und Katze ein. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015)

1.2 Ätiologie

Bei spontan oder experimentell induzierten Nierenzellkarzinomen ist bekannt, dass diese durch Viren, chemische Karzinogene oder durch Genmutationen verursacht werden können. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Ein viral bedingtes Nierenzellkarzinom ist der durch Herpesviren mitbedingte Lucke-Tumor beim Leopardschamane. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Des Weiteren kann der Stamm ES4 des aviären Erythroblastosevirus Nierenzellkarzinome beim Huhn hervorrufen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Ebenso treten Nierentumoren bei Infektionen mit feline Leukämieviren auf. Nitrosamine, aromatische Amine, Kadmium, Blei und Aflatoxine zählen zu den chemischen Stoffen, die karzinogen auf die Niere wirken können. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Unter den Genmutationen ist die autosomal dominante TSC2-Mutation in Eker-Ratten beschrieben, die eine Disposition für beidseitige Nierenzellkarzinome und weitere Neoplasien vergleichbar zu dem Von Hippel-Lindau-Syndrom des Menschen bewirkt. Hereditär bedingt treten Nierenzellkarzinome beim Deutschen Schäferhund

in Zusammenhang mit der nodulären Dermatofibrose auf. (LIUM & MOE, 1985; MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

1.3 Makroskopische und mikroskopische Darstellung epithelialer renaler Neoplasien

Zu den epithelialen Nierentumoren zählen die malignen Nierenzellkarzinome sowie die benignen Nierenadenome und Onkozytome.

Mit bis zu 20 cm im Durchmesser handelt es sich bei den Nierenzellkarzinomen um häufig große Tumoren. Sie stellen sich makroskopisch als sphärische bis ovoide Neoplasien mit fester Konsistenz dar. Meistens sind sie an einem Nierenpol zu finden. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Sie wachsen überwiegend lokal invasiv. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Durch ihre destruktive Ausbreitung kann es zur vollständigen Einnahme des Nierenpols kommen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Benachbartes Nierengewebe kann hierbei komprimiert werden. Im Anschnitt erscheinen die Nierenzellkarzinome oft blassgelb. Durch Blutungen kommen auch dunkle Areale vor. Nekrosen und zystische Degenerationen sind häufig zu finden. Mikroskopisch ist ein papilläres, tubuläres oder solides Wachstumsmuster charakteristisch. Hierbei weisen Nierenzellkarzinome mit solidem Wachstumsmuster die geringste Differenzierung auf. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Innerhalb eines Tumors können verschiedene dieser Wachstumsmuster auftreten. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Neben dieser rein histologischen Klassifizierung kann eine Einteilung anhand zusätzlicher zytologischer Kriterien erfolgen. In diesem Sinne unterteilten EDMONDSON und Mitarbeiter (2015) die von ihnen untersuchten Nierenzellkarzinome in die Subtypen klarzellig, chromophob, papillär und multilokulär zystisch. Zusätzlich unterschieden sie Tumoren mit sarkomatoider Differenzierung. Ferner orientierten sich auch andere Autoren bei der Einteilung von Nierenzellkarzinomen bei Hunden an den Subtypen, die in der Humanmedizin zur Differenzierung von Nierentumoren herangezogen werden. In diesem Zusammenhang sind Einzelfälle von chromophoben Nierenzellkarzinomen und einem Sammelrohrkarzinom beschrieben. (KOBAYASHI et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2010)

Im Gegensatz zu den meistens einseitig und solitär auftretenden spontanen Nierenzellkarzinomen sind diese im Zusammenhang mit der nodulären Dermatofibrose beim Deutschen Schäferhund multifokal und bilateral. (LIUM & MOE, 1985) Die Makroskopie dieser Tumoren und die vorkommenden Wachstumsmuster entsprechen denen der spontanen Nierenzellkarzinome, jedoch weisen sie deutlich mehr Zysten auf. Die Tumorzellen werden von fibrovaskulärem Stroma umgeben und sind häufig atypisch und anaplastisch. Ihre Größe und Form ist variabel. Sie können sowohl kubisch als auch säulenförmig oder polygonal sein. Das Zytoplasma ist klar oder granulär eosinophil. Auch die Kerne variieren in ihrer Größe und Form. Hierbei erstreckt sich das Spektrum von klein, rund, granulär und einheitlich bis hin zu groß, oval, vesikulär und pleomorph. Mitosefiguren sind reichlich zu finden. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

Seltener und mit einer Größe von 1-3 cm kleiner als die Nierenzellkarzinome sind die Nierenadenome. Entsprechend ihrer Entstehung aus kortikalen Nierenepithelzellen sind sie in der Nierenrinde zu finden. Sie treten solitär auf, weisen keine Kapsel auf und sind gut vom umliegenden Gewebe abgrenzbar. Die weißgelben Tumoren zeigen selten Nekrosen und Fibrosen. Das Wachstumsmuster in der Mikroskopie kann wie bei den Nierenzellkarzinomen solide, tubulär oder papillär sein. Die kubischen Epithelzellen weisen eine einheitliche Größe auf. Ihr Zytoplasma ist granulär eosinophil. Die Kerne sind klein und rund bis oval. Korrespondierend zur Dignität der Nierenadenome sind Mitosefiguren selten zu finden. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

Ebenfalls bei Haustieren selten sind die renalen Onkozytome. Im Gegensatz zu den Nierendenomen werden sie von einer Kapsel umgeben. In der Makroskopie stellen sich die Onkozytome homogen braun dar. Mikroskopisch bestehen sie aus den großen, eosinophil granulär, runden Onkozyten, deren Kerne dicht und rund sind. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

Ferner können Übergangszellpapillome und Übergangszellkarzinome nicht nur im unteren Harnapparat, sondern auch im Nierenbecken entstehen und in die Niere einbrechen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

1.4 Makroskopische und mikroskopische Darstellung embryonaler renaler Neoplasien

Als embryonaler Tumor kommt bei Haustieren das Nephroblastom vor. Es entsteht aus dem primitiven nephrogenen Blastem. Bei Schweinen kann es bis zu 20 kg schwer werden. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Nephroblastome treten sowohl solitär als auch multipel auf. Makroskopisch sind sie grau mit herdförmigen Blutungen und weisen eine weiche bis gummiartige Konsistenz auf. Im Anschnitt präsentieren sie sich meistens lobuliert. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Entsprechend der Genese aus primitivem pluripotentem Gewebe sind in der Mikroskopie prinzipiell sowohl epitheliale als auch mesenchymale Anteile zu finden. Bei letzteren kann es sich um für das Nephroblastom charakteristisches primitives, lockeres myxomatöses Gewebe oder um Binde-, Fettgewebe, Knorpel, Knochen sowie Skelettmuskulatur handeln. Die epithelialen Anteile stellen sich als primitive Glomerula und mit länglichen, dunkel gefärbten Zellen ausgekleidete, primitive Tubuli dar. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015)

1.5 Mikroskopische und makroskopische Darstellung mesenchymaler renaler Neoplasien

Bei Rind, Katze und Hund kommen regelmäßig maligne Lymphome in den Nieren vor. Hierbei kann es sich sowohl um die primäre Organform als auch um die generalisierte oder multizentrische Form handeln. (BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Letztere tritt bei Retrovirusinfektionen auf. Makroskopisch sind die malignen Lymphome entweder als homogene grauweiße Knoten sichtbar, die solitär oder multipel sein können, oder sie bewirken eine gesamthafte Vergrößerung und Aufhellung der Niere durch eine diffuse Infiltration. In der Mikroskopie wird das Nierenparenchym durch die neoplastischen Lymphozyten verdrängt. Diese weisen ein mittelmäßig basophiles Zytoplasma, deutliche Zellgrenzen und große, runde, vesikuläre Zellkerne auf. Die Nukleolen treten unterschiedlich deutlich in Erscheinung. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

Zu den eher selten in der Niere von Haustieren vorkommenden mesenchymalen Tumoren gehören Fibrome, Fibrosarkome, Hämangiome und Hämangiosarkome. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015)

1.6 Klinik

Nierenzellkarzinome werden bei Hunden und Pferden oft erst spät diagnostiziert. (WISE et al., 2009; EDMONDSON et al., 2015) Die klinischen Symptome des Nierenzellkarzinoms sind unspezifisch. Auftreten können bei Hund und Katze Hämaturie, Proteinurie, Polyurie/Polydipsie, Anorexie, Gewichtsverlust, Lethargie und eine palpierbare abdominale Umfangsvermehrung. (BRYAN et al., 2006; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Betroffene Pferde können neben Hämaturie und Gewichtsverluste auch eine Kolik zeigen. Diese Symptome treten bei Pferden jedoch erst spät auf. (WISE et al., 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015) Bei Hunden wurde beschrieben, dass diese bei renalen Sarkomen signifikant häufiger abdominale Schmerzen zeigen als bei

Nierenzellkarzinomen. (BRYAN et al., 2006) Ein weiteres mögliches Symptom bei Nierenzellkarzinomen ist eine Polyzythämie. Diese stellt eines der in Zusammenhang mit Nierenzellkarzinomen auftretenden, paraneoplastischen Syndrome dar und ist auf eine erhöhte Erythropoetinproduktion zurückzuführen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

Bei Hunden metastasieren die Nierenzellkarzinome häufig. Raten von bis zu 50 % sind beschrieben. Zielorgane stellen hierbei vor allem die Lunge, Lymphknoten, die Leber und die Nebennieren dar. Seltener findet eine Metastasierung bei Rindern statt. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015; EDMONDSON et al., 2015) Ferner sind Metastasen bei Pferden beschrieben und es ist anzunehmen, dass Nierenzellkarzinome bei den meisten Spezies häufig metastasieren. (WISE et al., 2009)

Sowohl die Nierenadenome als auch die Onkozytome sind meistens asymptomatisch und stellen daher in der Regel Zufallsbefunde bei der Sektion dar. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Es können allerdings auch Fälle vorkommen, in denen Nierenadenome mit Symptomen wie Anorexie, Hämaturie, Gewichtsverlust und einer palpierbaren abdominalen Umfangsvermehrung einhergehen. (LILLAKAS, 2013)

Die Nephroblastome bei Schwein und Huhn werden meistens zufällig bei der Schlachtung entdeckt. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009) Bei Hunden können Nephroblastome bei einer Lokalisation im Wirbelkanal (spinales oder ektopisches Nephroblastom) durch eine sekundäre Druckatrophie im befallenen Rückenmarksegment zu einer progressiven Querschnittslähmung führen. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; BAUMGÄRTNER & GRUBER, 2015)

1.7 Prognose und Therapiemöglichkeiten

Eine vollständige Tumoresektion stellt derzeit die einzige lebensverlängernde Therapiemöglichkeit bei Hunden mit Nierentumoren dar. Dementsprechend wurde für das mediane Überleben bei 82 Hunden mit Nierenzellkarzinom, renalem Sarkom oder Nephroblastom ein signifikanter Unterschied abhängig von dem chirurgischen Eingriff beschrieben. Das mediane Überleben lag bei unbehandelten Tieren unter einem Monat, während es bei operierten Tieren 16 Monate betrug. Eine Verlängerung des medianen Überlebens durch eine Chemotherapie war hingegen nicht signifikant. Allerdings handelte es sich um eine retrospektive Studie und es wurden daher verschiedene Protokolle für die Chemotherapie eingesetzt. (BRYAN et al., 2006) Nach einer Nephrektomie hängt die Prognose für Hunde mit Nierenzellkarzinomen von histologischen Kriterien ab. Die Überlebenszeit korreliert hierbei mit dem mitotischen Index, der Zellkerngröße, dem Grad des Pleomorphismus der Zellkerne, der Tumordifferenzierung und der Invasivität. Ferner ist sie im Mittel kürzer für Nierenzellkarzinome mit klarzelliger Morphologie. Bei einer multivariaten Analyse stellte sich der mitotische Index als einziges als unabhängiger prognostischer Faktor für Nierenzellkarzinome bei Hunden heraus. Dieser wurde als Anzahl der Mitosefiguren in zehn Feldern bei 400-facher Vergrößerung definiert. Bei einer Unterteilung des mitotischen Index in <10, 10-30 und >30 lag das mediane Überleben der Hunde bei 39, 15 und 6 Monaten. (EDMONDSON et al., 2015) Des Weiteren ist die Überlebenszeit von Hunden mit metastasierten Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu Tieren ohne eine nachgewiesene Metastasierung kürzer. (EDMONDSON et al., 2015)

Gleichfalls ist bei Pferden mit auf eine Niere begrenzten Nierenzellkarzinomen die Nephrektomie die Therapie der Wahl. Für diese Spezies wurde bislang keine Chemo- oder Radiotherapie für Nierenzellkarzinome beschrieben. Mit einer Überlebenszeit von 0 Tagen bis zu einem Jahr und im median 11 Tagen ist die Prognose für Pferde mit Nierenzellkarzinomen schlecht bis sehr schlecht. Da die Diagnose bei Pferden bisher meist erst zu einem fortgeschrittenen Stadium er-

folgte, in dem bereits Metastasen aufgetreten sind, könnte eine frühere Diagnose die Überlebenschancen verbessern. (WISE et al., 2009)

Ohne eine weitere Konkretisierung wurden in die Niere eingebrochene Übergangszellkarzinome als prognostisch ungünstig bewertet, während bei malignen Lymphomen der Niere eine Chemotherapie eine Erfolgschance bieten soll. (MCGAVIN & ZACHARY, 2009)

2 Renale Neoplasien beim Menschen

2.1 Epidemiologie und Einteilung

Im Jahr 2012 sind in Deutschland 9 500 Männer und 5 530 Frauen an malignen Nierentumoren neu erkrankt. Dies entsprach 3,8 % bzw. 2,4 % aller Neuerkrankungen an malignen Neoplasien. Die Niere stellte somit die sechshäufigste bzw. die zehnthäufigste Lokalisation für maligne Tumoren beim Mann bzw. der Frau dar. Bei Männern ist die Erkrankungsrate doppelt so hoch wie bei Frauen. Maligne Neoplasien in der Niere treten überwiegend bei Erwachsenen auf. Je nach Geschlecht liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 bzw. 72 Jahren. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015)

Insgesamt sind 2012 in Deutschland 5 256 Menschen an malignen Nierentumoren gestorben. Unter den malignen Neoplasien waren Nierentumoren beim Mann die 13. und bei der Frau die 12. häufigste Todesursache. Gemittelt auf alle malignen Nierentumoren beträgt die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate abhängig vom Geschlecht 76 % oder 78 %. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015) Allerdings kann die Prognose für den einzelnen Patienten anhand verschiedener Kriterien konkretisiert werden und in der Folge besser oder schlechter sein. Die pathologischen Kriterien, die neben der Entität der Neoplasie nachweislich eine Rolle spielen, werden für die drei in dieser Arbeit untersuchten Tumoren in den jeweiligen Kapiteln genannt. Bei Nierenkarzinomen mit Metastasen als Rezidiv liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei etwa 20 %. (TUMORREGISTER MÜNCHEN, 2016)

Zu den Risikofaktoren für sporadische Nierentumoren zählen vor allem Adipositas, Rauchen und Bluthochdruck. Die erworbene zystische Nierenerkrankung und eine berufliche Exposition gegenüber Trichlorethylen stellen weitere Nierentumoren begünstigende Faktoren dar. Neoplasien in der Niere treten bei einer chronischen Niereninsuffizienz, unabhängig von deren Ursache, gehäuft auf. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015; MOCH et al., 2016)

Die Nierentumoren des Menschen werden nach der aktuellen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wie folgt eingeteilt (MOCH et al., 2016):

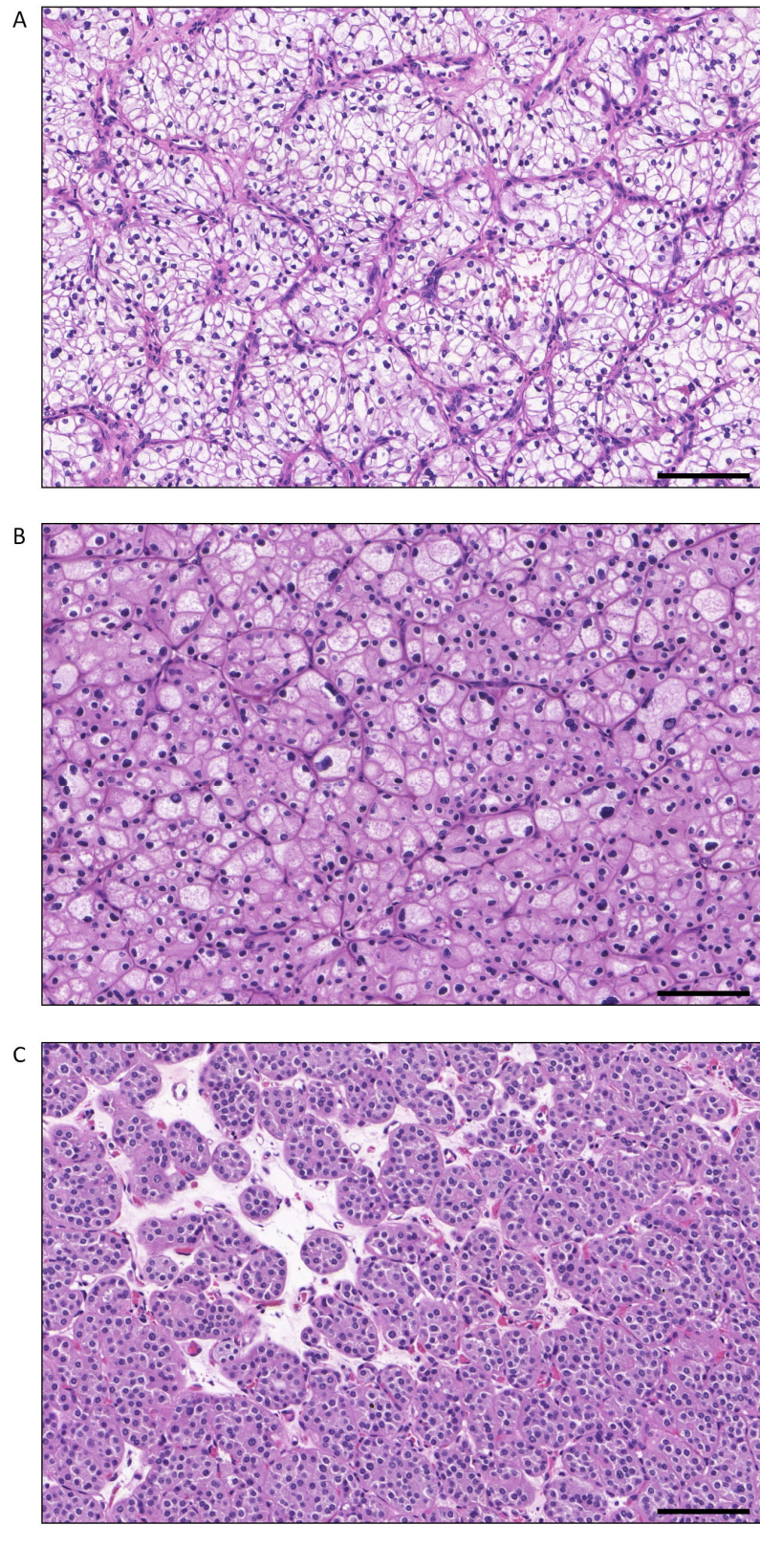
- Epitheliale Nierenzelltumoren
- Metanephrische Tumoren
- Nephroblastische und zystische Tumoren, die überwiegend bei Kindern auftreten
- Mesenchymale Tumoren
- Gemischte epitheliale und mesenchymale Tumoren
- Neuroendokrine Tumoren
- Sonstige Tumoren (hämatopoetische Neoplasien und Keimzelltumoren)
- Metastasen

Im Erwachsenenalter sind Nierenzellkarzinome mit einem Anteil von 90 % unter den malignen Nierentumoren am häufigsten. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015) Zusammen mit den be-

nigen Nierenzelltumoren werden folgende Entitäten nach der WHO Klassifikation unterschieden (MOCH et al., 2016):

- Klarzelliges Nierenzellkarzinom
- Multilokulär-zystischer Nierentumor mit niedrig-malignem Potenzial
- Papilläres Nierenzellkarzinom
- Nierenzellkarzinom bei hereditärem Leiomyomatose-/Nierenzellkarzinom-Syndrom
- Chromophobes Nierenzellkarzinom
- Sammelrohrkarzinom
- Medulläres Karzinom der Niere
- Nierenzellkarzinom mit Translokationen der MiT-Familie von Transkriptionsfaktoren
- Succinatdehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom
- Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom
- Tubulozystisches Nierenzellkarzinom
- Nierenzellkarzinom bei erworbener zystischer Nierenerkrankung
- Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom
- Nierenzellkarzinom, nicht näher klassifizierbar
- Papilläres Adenom
- Onkozytom

Eine ausführlichere Charakterisierung der einzelnen Entitäten ist in den nächsten Abschnitten auf die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Neoplasien beschränkt. Diese treten unterschiedlich häufig auf. Unter den malignen Tumoren ist das klarzellige Nierenzellkarzinom mit einem Anteil von 65-70 % die häufigste Neoplasie. Das chromophobe Nierenzellkarzinom macht 5-7 % aller Nierenzellkarzinome aus. Bezogen auf alle Nierenzelltumoren handelt es sich bei etwa 5-9 % um Onkozytome. (MOCH et al., 2016)



100 μm

Abbildung II-1. Histologie der analysierten renalen Neoplasien. A: Klarzelliges Nierenzellkarzinom. B: Chromophobes Nierenzellkarzinom. C: Renales Onkozytom. (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 μm.)

2.2 Klarzellige Nierenzellkarzinome

2.2.1 Definition

Klarzellige Nierenzellkarzinome (ccRCC) stellen eine morphologisch heterogene Gruppe maligner Neoplasien dar, die aus hellen oder eosinophilen Zellen bestehen. Sie werden durch die für sie typische Gefäßformation und auf der Grundlage molekularbiologischer Aspekte charakterisiert. Letztere umfassen eine Inaktivierung des Von Hippel-Lindau-Gens (VHL) und eine Hochregulierung des Hypoxie-induzierten Faktors. (MOCH et al., 2016)

2.2.2 Ätiologie

Meist treten die ccRCC sporadisch auf, aber auch eine familiäre Disposition ist in seltenen Fällen möglich. Diese kommt z. B. im Zusammenhang mit dem Von Hippel-Lindau Syndrom vor. (MOCH et al., 2016)

2.2.3 Genetischer Hintergrund

Es wird angenommen, dass ccRCC aus den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli entstehen. (OOSTERWIJK et al., 2011; DAVIS et al., 2014) Genetische Veränderungen betreffen in der Mehrheit der ccRCC biallelisch das VHL-Gen. (GNARRA et al., 1994; MOCH et al., 2016) Die Inaktivierung kann durch eine chromosomale Deletion, Mutation oder über epigenetische Mechanismen erfolgen. (REUTER et al., 2014) Das VHL-Gen codiert das gleichnamige Protein, welches verschiedene Effektorproteine rekrutiert, um so an anderen Zielproteinen wirken zu können. Eines dieser Zielproteine ist der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor α (HIF α). Dieser fördert die Transkription zahlreicher Hypoxie-assozierter Gene, wie des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), des Platelet-derived Growth Factors und des Glukose-Transporters 1. Bei normaler Sauerstoffkonzentration bewirkt das VHL-Protein eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von HIF α . Bei einer Hypoxie liegt HIF α jedoch nicht hydroxyliert vor und kann daher durch das VHL-Protein nicht erkannt werden. Dies führt genauso wie die Veränderungen des VHL-Gens bei den ccRCC zur Akkumulation von HIF α und folglich zur Transkription der Hypoxie-assoziierten Gene und Wachstumsfaktoren. (KAELIN, 2002; LINEHAN et al., 2010; MOCH et al., 2016) Es wird angenommen, dass der Verlust der Funktion des VHL-Proteins zur Tumorentstehung, -progression und zur Metastasierung beiträgt. (MOCH et al., 2016) Darüber hinaus konnten durch Genomsequenzierungen zahlreiche weitere Mutationen im Genom der ccRCC bestimmt werden. (MOCH et al., 2016)

2.2.4 Klinik

Klinische Symptome müssen insbesondere bei noch kleinen Nierentumoren nicht unbedingt auftreten. (LJUNGBERG et al., 2015) Dem entsprechend werden 60-80 % aller Nierentumoren zufällig im Ultraschall, bei der Computertomographie oder der Magnetresonanztomographie entdeckt. (MOCH et al., 2016) Wenn Nierentumoren eine Symptomatik bewirken, dann sind Hämaturie, Schmerzen in der Nierengegend und eine palpierbare abdominale Umfangsvermehrung die häufigsten Symptome. (LJUNGBERG et al., 2015; MOCH et al., 2016) Im fortgeschrittenen Stadium kommen auch Gewichtsverlust und Fieber vor. (MOCH et al., 2016) Bei etwa 30 % der Patienten mit symptomatischen Nierenzellkarzinomen tritt ein paraneoplastisches Syndrom auf. (LJUNGBERG et al., 2015)

Der Anteil an inzidentell detektierten und hierdurch frühzeitig diagnostizierten Nierenzellkarzinomen hat deutlich zugenommen. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015) Dennoch haben etwa 20-30 % aller Nierenzellkarzinome zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen gebildet. Nach einer Therapie treten bei 20-30 % der Patienten eine asynchrone Metastase oder

ein lokales Rezidiv auf. Ein lokales Rezidiv ist dabei allerdings relativ selten. (DABESTANI et al., 2016) Mit 60-70 % ist die Lunge von metastasierten Nierenzellkarzinomen am häufigsten betroffen. Auch Metastasen in den regionären Lymphknoten sind häufig. Diese treten bei 60-65 % der Fälle auf. Bei 39-40 % der Patienten mit Metastasen sind die Knochen betroffen und 19-40 % haben Filiae in der Leber. Metastasen im Gehirn werden bei 5-7 % der Fälle nachgewiesen. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015) Des Weiteren können Weichgewebe, die Pleura und die Nebennieren betroffen sein. Neben weiteren typischen Lokalisationen sind Metastasen von ccRCC auch an ungewöhnlichen Stellen möglich. (MOCH et al., 2016)

2.2.5 Makroskopische und mikroskopische Darstellung

Die ccRCC entstehen typischerweise in der Nierenrinde, wobei beide Nieren gleich häufig betroffen sind. In der Regel handelt es sich um einen solitären Tumor. Der Anteil an Fällen, bei denen ccRCC multifokal und/oder bilateral vorkommen, liegt unter 5 %. (MOCH et al., 2016)

Makroskopisch stellen sich die ccRCC als runde, aus der Nierenrinde herausragende Tumoren dar. Normalerweise ist die Grenze zur Niere durch Ausbildung einer Pseudokapsel scharf. Eine diffuse Infiltration der Niere ist selten. Die ccRCC können sehr groß werden und in den Nierensinus und die Nierenvene eindringen. Typischerweise erscheinen sie, aufgrund des hohen Lipidgehalts ihrer Zellen, goldgelb. Zysten, Nekrosen und Hämorrhagien sind häufig. Darüber hinaus können Kalzifikationen und Ossifikationen vorkommen. (MOCH et al., 2016)

Die mikroskopische Architektur der ccRCC ist mannigfaltig, wobei solide, alveoläre und azinäre Wachstumsmuster am häufigsten vorzufinden sind. Charakteristisch für die ccRCC ist ein gleichmäßiges Netzwerk kleiner, dünnwandiger Blutgefäße. Dieses kann hilfreich für deren Diagnose sein. Während beim alveolären Wachstum kein Lumen in Erscheinung tritt, ist beim azinären Wachstum ein zentraler, runder, luminaler Raum mit acidophiler, seröser Flüssigkeit oder Erythrozyten gefüllt. Eine Erweiterung sowohl der azinären als auch der alveolären Strukturen ist möglich. Diese führt zu mikro- und makrozystischen Strukturen. Ungewöhnlicher Weise kann das Wachstumsmuster fokal auch ausgeprägt tubulär und selten pseudopapillär sein. (MOCH et al., 2016)

Das Zytoplasma der Tumorzellen ist bei den ccRCC häufig mit Lipiden und Glykogen gefüllt, die bei den routinemäßigen histologischen Färbungen herausgelöst werden. Infolgedessen zeigen sie ein helles Zytoplasma, das von einer deutlichen Zellmembran umgeben wird. Viele ccRCC weisen auch Zellen mit eosinophilem Zytoplasma auf. Diese sind vor allem in schlecht differenzierten Tumoren und angrenzend an nekrotische oder hämorrhagische Areale zu finden. (MOCH et al., 2016)

Bei einer guten Präparation sind die Zellkerne der ccRCC rund mit gleichmäßig verteiltem Chromatin. Abhängig von der Graduierung sind deren Nukleolen unauffällig und klein oder groß und prominent. Bizarr geformte Zellkerne können genauso wie sehr große Kerne ohne Nukleolen gelegentlich auftreten. (MOCH et al., 2016)

In Teil A der Abbildung II-1 (siehe Seite 9) ist ein Ausschnitt eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (HE) Gewebeschnitts eines typischen ccRCC abgebildet.

Neben der üblichen Histopathologie wurden für die ccRCC zahlreiche unübliche Befunde beschrieben. Sowohl ein sarkomatoides als auch ein rhabdoides Wachstum kommen jeweils in etwa 5 % der ccRCC vor und werden mit einer schlechten Prognose assoziiert. (DE PERALTA-VENTURINA et al., 2001; MOCH et al., 2016) Ferner weisen manche ccRCC einen zentralen Bereich mit fibromyxoidem Stroma auf. Unüblich ist auch eine hochgradige Infiltration durch Lym-

phozyten oder neutrophile Granulozyten, da die meisten ccRCC mit einer nur geringgradigen Entzündungsreaktion einhergehen. (MOCH et al., 2016)

Ein immunhistochemischer Marker, der gut geeignet ist, um Nierenzellkarzinome von anderen Tumoren zu unterscheiden ist das Paired box protein PAX8. Dieses wird konsistent von allen Nierenzellkarzinomen exprimiert. Dieser Marker kann somit die Diagnose von Metastasen der Nierenzellkarzinome in anderen Organen unterstützen. Zur Abgrenzung von Metastasen anderer Tumoren kann ferner die Negativität der Nierenzellkarzinome für Östrogenrezeptor, Homeobox protein CDX2, prostataspezifisches Antigen, thyroidalen Transkriptionsfaktor TTF-1 und p63 genutzt werden. Häufig immunhistochemisch gefärbt werden auch CD10 und Renal cell carcinoma marker-gp200 (RCC), deren Positivität bei Nierenzellkarzinomen ist jedoch nicht spezifisch. (REUTER et al., 2014)

In der Regel ist eine eindeutige Diagnose des Subtyps anhand der Morphologie des Nierenzellkarzinoms möglich. In manchen Fällen, wie z. B. bei einer schlechten Differenzierung oder einer komplexen Morphologie mit verschiedenen Wachstumsmustern kann die Diagnose erschwert sein. In solchen Fällen können immunhistochemische Marker die Diagnose erleichtern. Hierzu wird der Einsatz einer an die abzuklärenden Differentialdiagnosen angepassten Gruppe von Markern empfohlen. Bei ccRCC können immunhistochemische Marker unter anderem zur Abgrenzung von anderen Subtypen mit klarzelligem Charakter, wie z. B. klarzelligen papillären und klassischen chromophoben Nierenzellkarzinomen eingesetzt werden. Hierbei dienen die diffus membranäre Positivität der ccRCC für Carbonic anhydrase IX, deren Negativität für Cytokeratin 7 (ck7) und CD117 sowie mit Einschränkungen ihre Positivität für Vimentin (VIM) der Diagnoseabsicherung. (REUTER et al., 2014)

Des Weiteren wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedenste immunhistochemische Marker auf ihren prognostischen und prädiktiven Wert bei Nierentumoren untersucht. Bisher stellte sich hierbei jedoch kein Marker als reproduzierbar und für den diagnostischen Einsatz geeignet heraus. (REUTER et al., 2014)

2.2.6 Prognose

Die Bestimmung der Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinomen erfolgt nach einer Tumorresektion anhand pathologischer Kriterien. Der wichtigste prognostische Faktor ist hierbei das Tumorstadium. Dieses umfasst neben der Größe des Primärtumors, dessen lokale Invasivität in Bezug auf das perirenale Gewebe und das Ausmaß einer intravenösen Invasion. (TRPKOV et al., 2013) Die TNM Klassifikation berücksichtigt neben diesen Kriterien zusätzlich das Vorhandensein von Metastasen in den regionären Lymphknoten und in anderen Organen. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Eine Klassifizierung von Nierenzellkarzinomen nach der aktuellen, siebten Edition der TNM Klassifikation liefert einen starken prognostischen Parameter. (TRPKOV et al., 2013) Bei Nierenkarzinomen ohne Metastasen liegt die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 98 %, 86 % und 75 % für die T-Kategorien 1, 2 und 3. Treten zusätzlich Metastasen in den regionären Lymphknoten oder Fernmetastasen auf, so reduziert sich die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate auf 31,7 % bzw. 15,5 %. (TUMORREGISTER MÜNCHEN, 2016) Innerhalb eines Tumorstadiums werden die Graduierung, das Auftreten von Nekrosen sowie eine sarkomatoide und rhabdoide Differenzierung als bedeutend für die Prognose bewertet. (DELAHUNT et al., 2013) Für die Graduierung wird aktuell das von der International Society of Urological Pathology (ISUP) vorgeschlagene System empfohlen. (MOCH et al., 2016)

Im Vergleich zu papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen weisen ccRCC höhere Tumorstadien und Graduierungen auf. Ferner ist das Risiko für eine Metastasierung nach einer

Therapie bei ccRCC im Vergleich zu den anderen beiden Subtypen größer. (DELAHUNT et al., 2013) Insbesondere bei frühen Stadien mit niedriger Graduierung ist die Prognose für Patienten mit ccRCC schlechter als für Patienten mit papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen mit gleichem Tumorstadium und gleicher Graduierung. (LEIBOVICH et al., 2010)

2.3 Chromophobe Nierenzellkarzinome

2.3.1 Definition

Das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC) wird durch die Morphologie seiner Zellen charakterisiert. Diese weisen eine prominente Zellmembran, einen runzeligen Zellkern mit einem perinukleären Halo und ein blasses bis eosinophiles Zytoplasma auf. (MOCH et al., 2016)

2.3.2 Ätiologie

Die meisten chRCC treten sporadisch auf. Hereditäre Formen sind unüblich, kommen aber vor. Insbesondere im Zusammenhang mit dem autosomal dominant vererbten Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sind chRCC gehäuft vorzufinden. (MOCH et al., 2016)

2.3.3 Genetischer Hintergrund

Anhand ihrer Histomorphologie und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sowie Immunhistochemie wurde vor längerem festgestellt, dass die chRCC histogenetisch den Zwischenzellen der Sammelrohre ähnlich sind. (STÖRKEL et al., 1989) Eine aktuellere Studie zum Genom der chRCC, wonach die chRCC aus Zellen des distalen Nephrons entstehen, unterstützt diese frühere Annahme. (DAVIS et al., 2014)

Die chRCC weisen verschiedene Chromosomenverluste auf. Betroffen sein können die Chromosomen Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21. Zusätzlich kommen häufig Mutationen in der mitochondrialen DNA sowie in den Genen TP53 und PTEN vor. (MOCH et al., 2016)

2.3.4 Klinik

Die chRCC stellen meist einen Zufallsbefund dar. Abgesehen von den in Kapitel II.2.2.4 beschriebenen allgemein bei Nierentumoren möglichen Symptomen gibt es keine für die chRCC spezifische Symptomatik. (MOCH et al., 2016)

Rezidive oder Metastasen treten in 7 % der Fälle auf. (AMIN et al., 2008)

2.3.5 Makroskopische und mikroskopische Darstellung

Die meisten chRCC bleiben auf die Niere begrenzt. Sie sind deutlich abgrenzbar und haben keine fibröse Kapsel. Mit einem Durchmesser von im Mittel 7-8 cm handelt es sich oft um große Tumoren. (AMIN et al., 2008; MOCH et al., 2016) In 8 % der Fälle treten die chRCC multifokal und in 3 % der Fälle bilateral auf. (AMIN et al., 2008) In der Makroskopie variiert ihre Farbe zwischen Beige bis Braun, wobei die Intensität von der Konzentration der eosinophilen Zellen abhängt. Zentral tritt manchmal eine Vernarbung auf. (AMIN et al., 2008; MOCH et al., 2016)

Mikroskopisch präsentieren sich die chRCC typischerweise mit einem soliden, plattenartigen Wachstumsmuster mit unvollständigen, häufig hyalinisierten, vaskulären Septen. Alternativ können die Zellen auch in kleinen Nestern oder selten tubulär, mikrozystisch, trabekulär oder fokal papillär angeordnet sein. (MOCH et al., 2016)

Anhand der Zellmorphologie werden bei den chRCC zwei Typen unterschieden: die klassischen chRCC und die eosinophile Variante. Bei ersterem dominieren große, blasse Zellen mit retikulärem Zytoplasma und prominenten Zellmembranen. Die Zellen des klassischen chRCC werden daher auch häufig als pflanzenzellartig beschrieben. Die Zellen der eosinophilen Varian-

te sind überwiegend kleiner und mit feinen, azidophilen Granula. Typischerweise treten beide Zelltypen gemischt auf, wobei sie innerhalb der Platten oder Nester unterschiedlich lokalisiert sind. Die eosinophilen Zellen befinden sich dabei normalerweise zentral und die blassen Zellen in der Peripherie. Vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Entwicklung der Mitochondrien treten zahlreiche Mikrovesikel im Zytoplasma der chRCC auf. Diese stellen ein ultrastrukturelles Charakteristikum der chRCC dar und bewirken eine diffuse, cytoplasmatische Positivität in der kolloidalen Eisenfärbung nach Hale. Die Mikrovesikel sind vor allem bei den blassen Zellen des klassischen Typs reichlich vorhanden, während die eosinophilen Zellen einen Überschuss an Mitochondrien aufweisen. (MOCH et al., 2016)

Die Zellkerne der Tumorzellen werden aufgrund ihres oft markanten, unregelmäßigen, runzeligen Aussehens als rosinenartig beschrieben. Das Chromatin ist hierbei meistens grobkörnig. Häufig treten binukleäre Zellen und Zellen mit einer durch einen perinukleären Halo charakterisierten koilozytischen Atypie auf. Dennoch sind auch runde, regelmäßige Zellkerne insbesondere bei den eosinophilen Zellen nicht ungewöhnlich. (MOCH et al., 2016) Eine sarkomatoide Differenzierung ist in 8 % der Fälle zu finden. (AMIN et al., 2008)

Die typische Histologie der chRCC wird in Form eines Ausschnitts aus einem HE-gefärbten Gewebeschnitts in Teil B der Abbildung II-1 (siehe Seite 9) gezeigt.

In der Immunhistochemie (IHC) sind chRCC negativ für Carbonic anhydrase IX, membranär positiv für CD117 und ck7. (REUTER et al., 2014) Im Allgemeinen zeigen chRCC keine Reaktivität für VIM. (MOCH et al., 2016)

Die häufigste diagnostische Herausforderung stellt die Abgrenzung der eosinophilen Variante der chRCC von renalen Onkozytomen (RO) dar. Neben einer gründlichen Begutachtung des Wachstumsmusters, der Zellkerne und des Zytoplasmas kann hierbei die IHC unterstützen. Ein hierzu empfohlener Marker ist ck7. Allerdings zeigen gerade die eosinophilen Zellen nicht immer die für die chRCC typische Positivität für ck7. Eine weitere Option stellt das Kidney-specific Cadherin dar. Dieses wird von chRCC membranär/cytoplasmatisch und von den RO überwiegend cytoplasmatisch exprimiert. Inwiefern sich dieses zur Unterscheidung zwischen eosinophilem chRCC und RO eignet, muss jedoch weiter geprüft werden. Gleiches gilt für die Negativität der meisten chRCC für das S100 Kalzium-bindende Protein A1 und die zwischen RO und chRCC unterschiedliche Expression von Claudine 7 und 8. Weiterhin kann die Diagnose durch die bereits erwähnte cytoplasmatische Positivität der chRCC in der kolloidalen Eisenfärbung nach Hale unterstützt werden, da RO hierbei negativ sind. Diese Färbung ist allerdings schwer zu standardisieren. (REUTER et al., 2014) Eine aktuelle Übersicht der im Hinblick auf die Differenzierung zwischen chRCC und RO untersuchten immunhistochemischen Biomarker haben NG und Mitarbeiter (2016) erstellt. Sie empfehlen eine Gruppe von Markern, stellen aber gleichzeitig fest, dass bisher kein robuster und konsistent reproduzierbarer immunhistochemischer Marker zur eindeutigen Diskriminierung dieser beiden Entitäten gefunden wurde.

2.3.6 Prognose

Die pathologischen Kriterien anhand derer eine Beurteilung der Prognose für Patienten mit Nierenzellkarzinomen vorgenommen werden kann wurden bereits in Kapitel II.2.2.6 erläutert. Eine Besonderheit bei den chRCC besteht darin, dass sie aufgrund der für sie typischen Kernatypien nicht nach dem üblichen System graduiert werden können. (MOCH et al., 2016)

Im Allgemeinen ist die Prognose bei chRCC sehr gut. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei 78-100 %. (AMIN et al., 2008; MOCH et al., 2016)

2.3.7 Hybridtumoren aus Onkozytom und chromophobem Nierenzellkarzinom

Neben den chRCC und RO wurden Hybride aus diesen beiden Entitäten beschrieben. Nach der Vancouver Klassifikation für renale Neoplasien der International Society of Urological Pathology (ISUP) werden diese Hybridtumoren momentan unter den chRCC eingeordnet. (SRIGLEY et al., 2013)

Diese Tumoren weisen eine Mischung aus Zellen auf, deren Morphologie sowohl Charakteristika der chRCC als auch der RO zeigt. Sie können sporadisch oder im Zusammenhang mit einer renalen Onkozytose auftreten. Darüber hinaus kommen sie bei Patienten mit Birt-Hogg-Dubé-Syndrom vor. (SRIGLEY et al., 2013) Insbesondere bei den nicht sporadischen Fällen treten sie gehäuft multifokal oder bilateral auf. (AMIN et al., 2008; SRIGLEY et al., 2013)

2.4 Renale Onkozytome

2.4.1 Definition

Onkozytome sind benigne, epitheliale Tumoren mit solider Wuchsform. Dabei können die Zellen auch in Nestern angeordnet sein und Zysten vorkommen. Sie bestehen aus großen, eosinophilen Zellen, die reich an Mitochondrien sind. (MOCH et al., 2016)

2.4.2 Ätiologie

Die RO sind sporadisch vorkommende Tumoren. Abgesehen von einer Assoziation mit dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sind keine genetischen Dispositionen bekannt. (MOCH et al., 2016)

2.4.3 Genetischer Hintergrund

Die Ähnlichkeiten zwischen chRCC und RO lassen darauf schließen, dass die RO wie für die chRCC angenommen aus den Zellen der Sammelrohre entstehen. (OOSTERWIJK et al., 2011; DAVIS et al., 2014; JOSHI et al., 2015)

Das genetische Profil der RO ist unterschiedlich. Häufige Abweichungen im Genom umfassen den Verlust der Chromosomen 1, Y und 14 sowie Veränderungen bei 11q13. Bei letzterem sind Translokationen am häufigsten. (MOCH et al., 2016) Eine Unterteilung der meisten RO je nach auftretender chromosomaler Anomalität in zwei Subtypen ist möglich und wurde durch Clusteranalysen unterstützt. Demnach erfolgt eine Zuordnung zu einem Subtyp bei vollständigem oder teilweise allelischem Verlust des Chromosoms 1 in Kombination mit einer Deletion eines Geschlechtschromosoms. Bei diesem aneuploiden Subtyp kann ferner das Chromosom 14 und 21 fehlen. Der zweite Subtyp ist diploid und wird durch Veränderungen von 11q13 charakterisiert. (GASPARRE et al., 2011; JOSHI et al., 2015) Häufig treten bei RO Mutationen, die mit einem Funktionsverlust einhergehen, in für mitochondriale Proteine codierenden Genen auf. Hierbei ist sowohl das nukleäre als auch das mitochondriale Genom betroffen. (JOSHI et al., 2015)

2.4.4 Klinik

Die Mehrheit der RO ist asymptomatisch und wird daher bei von diesen unabhängigen radiologischen Untersuchungen diagnostiziert. Nur wenige Patienten zeigen Symptome wie Hämaturie, Schmerzen in der Nierengegend, Dysurie, Gewichtsverlust oder eine palpierbare, abdominale Umfangsvermehrung. (MOCH et al., 2016) Aufgrund der Benignität der RO wäre eine präoperative Diagnose dieser wünschenswert, um insbesondere kleine Tumoren konservativ zu behandeln. Aus diesem Anlass wurde versucht, spezifische Merkmale in der bildgebenden Diagnostik zu identifizieren. Bisher konnten jedoch keine eindeutigen Unterscheidungsmerkmale zu anderen renalen Neoplasien bestimmt werden. (CHOUDHARY et al., 2009)

2.4.5 Makroskopische und mikroskopische Darstellung

Die RO treten normalerweise solitär in der Nierenrinde auf, können aber auch multifokal und/oder bilateral vorkommen. Während sie typischerweise verdrängend wachsen und hierdurch vom umliegenden Gewebe scharf abgrenzbar sind, kommt gelegentlich auch ein infiltratives Wachstum vor. Hierbei können sich die RO in das perirenale Fettgewebe oder den Nierensinus ausbreiten. Außerdem wölben sich auch nicht infiltrierende, große RO in das Nierenmark, das perirenale Fettgewebe oder den Nierensinus vor. (MOCH et al., 2016) In sehr seltenen Fällen dringen RO in die Äste der Nierenvene ein. (HES et al., 2008)

In der Makroskopie stellen sich die RO typischerweise mahagonibraun, hellbraun oder gelb dar. Eine häufig auftretende Vernarbung ist meist zentral lokalisiert und sternförmig. Deutlich sichtbare Einblutungen können vorkommen, während Nekrosen sehr selten sind. (MOCH et al., 2016)

Die mikroskopische Morphologie der RO ist sehr unterschiedlich. Charakteristisch sind einzelne Nester und kleine Inseln von Onkozyten, die von einem lockeren, zellarmen Bindegewebe umgeben werden. Ein überwiegend mikro- oder makrozystisches Erscheinungsbild ist ebenfalls häufig. Kleine papilläre Strukturen können in seltenen Fällen fokal innerhalb tubulär oder zystisch wachsenden Arealen auftreten. Ansonsten zeigen Onkozytome kein papilläres Wachstumsmuster. Das Stroma kann unauffällig sein oder innerhalb des Tumors überwiegen. Dystrophische Verkalkungen oder Ossifikationen sind selten und koagulative Nekrosen kommen nicht vor. (MOCH et al., 2016)

Die RO bestehen aus großen, meist runden, eosinophilen Zellen, den Onkozyten. Das Zytoplasma der Onkozyten ist dicht granulär. Normalerweise sind die Zellkerne rund und regelmäßig. Nukleolen sind sichtbar, aber klein. Häufig sind auch binukleäre Zellen zu finden. Gewöhnlich kommen darüber hinaus an die Vernarbung angrenzend oder am Rand epithelialer Inseln kleine Zellen vor. Das Zytoplasma dieser sogenannten Onkoblasten ist spärlich. In seltenen Fällen können RO nahezu ausschließlich aus Onkoblasten bestehen, wobei die Onkoblasten rosettenförmig um hyalines Material angeordnet sein können. Des Weiteren sind innerhalb ansonsten typischer RO Cluster bizarr geformter Zellen mit pleomorphen und hyperchromatischen Zellkernen möglich. Hierbei wird davon ausgegangen, dass diese Zellen degeneriert sind. Mitosefiguren sind außerordentlich selten und atypische Mitosefiguren kommen nicht vor. (MOCH et al., 2016)

Ein Ausschnitt eines HE-gefärbten Gewebeschnitts eines typischen RO ist in Teil C der Abbildung II-1 (siehe Seite 9) gezeigt.

Die Bedeutung der IHC bei der Differenzierung zwischen RO und chRCC wurde bereits in Kapitel II.2.3.5 erläutert. Im Hinblick auf die dort genannten Marker zeigen die RO eine Negativität für ck7. Allerdings können einzelne Onkozyten, fleckig verteilte Gruppen von Zellen oder eingeschlossene Nierentubuli ck7 positiv sein. Für das Kidney-specific Cadherin zeigen RO eine überwiegend cytoplasmatische und für das S100 Kalzium-bindende Protein A1 eine nukleäre und cytoplasmatische Positivität. (REUTER et al., 2014) Darüber hinaus reagieren RO in der IHC im Allgemeinen positiv bei CD117 und negativ bei VIM. (MOCH et al., 2016)

2.4.6 Onkozytose

Treten RO multipel auf, so wird dies als Onkozytose bezeichnet. Eine Onkozytose ist selten. Hierbei können neben den RO auch Ansammlungen onkozytischer Zellen im Interstitium, onkozytische Veränderungen in unveränderten Tubuli und von onkozytischen Zellen ausgekleidete Zysten auftreten. Vor dem Hintergrund einer Onkozytose können chRCC und/oder Hybridtumoren

ren aus RO und chRCC auftreten. Inzwischen wird für die meisten dieser Fälle ein Zusammenhang zum Birt-Hogg-Dubé-Syndrom angenommen. (MOCH et al., 2016)

2.4.7 Prognose

Da Onkozytome benigne Tumoren darstellen, ist eine Bestimmung des Tumorstadiums nicht notwendig. (MOCH et al., 2016)

2.5 Therapiemöglichkeiten

Beim lokal begrenzten Nierenzellkarzinom wird eine chirurgische Resektion empfohlen. Sofern möglich, soll diese organerhaltend erfolgen. In Ausnahmefällen ist bei kleinen (<4 cm) Tumoren stattdessen eine aktive Überwachung oder eine Kryo- bzw. Radiofrequenzablation möglich. Die Gründe hierfür können z. B. ein erhöhtes Lebensalter oder eine hohe Komorbidität sein. Derzeit gibt es keinen Tumormarker für die Verlaufskontrolle. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015)

Treten synchron Metastasen auf, sollte der Primärtumor nach Möglichkeit ebenfalls operativ entfernt werden. Eine lokale operative Therapie oder Radiotherapie wird bei solitären Metastasen und vollständiger Resektabilität empfohlen. Zusätzlich können nicht vollständig resezierbare Metastasen und eine Oligometastasierung in einem Organsystem mittels Radiotherapie behandelt werden. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015)

Eine Systemtherapie bei metastasierten Nierenzellkarzinomen sollte bei asymptomatischen Patienten mit günstiger oder intermediärer Prognose erst bei nachgewiesenem Progress und fehlender Möglichkeit zur lokalen Therapie erfolgen. Besteht eine tumorbedingte Symptomatik oder eine schlechte Prognose, so wird hingegen ein zeitnaher Beginn der Systemtherapie empfohlen. Insbesondere das häufige klarzellige Nierenzellkarzinom ist jedoch gegenüber den üblichen zytotoxischen bzw. zytostatischen Substanzen der klassischen Chemotherapie nahezu komplett resistent. Daher wird diese genauso wie eine alleinige, subkutane Immuntherapie mit den Zytokinen Interleukin-2 und/oder Interferon- α nicht empfohlen. Einen gravierenden Einschnitt in der systemischen Behandlung von metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen hat die Einführung der zielgerichteten Therapie gebracht. Sie stellt aktuell die Empfehlung für eine systemische Therapie dar. Zum Einsatz kommen dabei VEGF-Tyrosinkinaseinhibitoren wie z. B. Sunitinib, Sorafenib oder Axitinib und die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus. (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, 2015)

3 Valosin-enthaltendes Protein

Valosin-enthaltendes Protein (Valosin-containing protein, VCP) ist nach wie vor der in der Literatur gebräuchliche Name für ein 97 kDa schweres Protein. (XIA et al., 2016) Wie von KOLLER und BROWNSTEIN (1987) angenommen und GILL und Mitarbeiter (1989) bestätigt, handelt es sich hierbei jedoch nicht wie der Name suggeriert um ein Vorläuferprotein für das Peptid Valosin. Vielmehr ist das vorher isolierte Valosin nicht ein biologisch aktives Peptid, sondern ein Extraktionsartefakt. Alternative Namen für VCP sind p97 oder, gemäß einer der Lokalisationen und Funktionen dieses Proteins, transitional endoplasmic reticulum Adenosintriphosphatase (TER ATPase). (XIA et al., 2016)

VCP gehört zur Familie der mit diversen zellulären Aktivitäten assoziierten Adenosintriphosphatasen (ATPasen). Diese weisen eine evolutionär hochkonservierte ATPase Domäne auf und erfüllen verschiedene zelluläre Funktionen. (PATEL & LATTERICH, 1998; FUJITA et al.,

2013) VCP kommt ubiquitär und abundant bei allen Eukaryoten vor. (XIA et al., 2016) Bei Säugtieren befindet es sich hauptsächlich im Zytoplasma, wobei es teilweise an den Membranen von Zellorganellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien und den Endosomen lokalisiert ist. (XIA et al., 2016)

Den verschiedenen Lokalisationen und dem ubiquitären Vorkommen entsprechend sind auch die Funktionen von VCP zahlreich. (MEYER et al., 2012) Sie basieren jedoch auf einem gemeinsamen Prinzip, wonach VCP die bei der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) freiwerdende Energie zur Abspaltung von Polypeptiden aus Proteingruppen oder zellulären Strukturen nutzt. Bei letzterem kann es sich sowohl um Membranen von Zellorganellen als auch um Chromatin handeln. Die Proteine werden im Anschluss zur Degradierung den Proteasomen zugeführt oder recycelt. Die meisten bekannten Substrate von VCP sind ubiquitiniert, weshalb anzunehmen ist, dass die Funktionalität von VCP ubiquitinabhängig ist. Des Weiteren sind für die Aktivität von VCP zahlreiche Cofaktoren nötig, die unter anderem als Schaltstücke fungieren, um VCP an spezifische Zellkompartimente oder Substrate zu binden. (MEYER & WEIHL, 2014; XIA et al., 2016)

Die vielfältigen Funktionen von VCP lassen sich im Wesentlichen in drei Kategorien einteilen. (XIA et al., 2016) Zum einen ist VCP für die Proteinhomöostase bedeutsam. Die Prozesse zur Proteinqualitätskontrolle, an denen VCP beteiligt ist, finden an mehreren Zellorganellen statt. Am endoplasmatischen Retikulum ist VCP an der sogenannten endoplasmic reticulum-associated degradation beteiligt. Diese dient der Elimination falsch gefalteter Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum. Neben diesen falsch gefalteten Proteinen kann VCP auch membrangebundene Transkriptionsfaktoren aus der Membran des endoplasmatischen Retikulums freisetzen. Diese werden nicht degradiert, sondern gelangen in den Zellkern und beeinflussen dort die Genexpression. Ferner ermöglicht VCP die Mitochondrien-assoziierte Degradation von Polypeptiden der äußeren Mitochondrienmembran. Diese ist entscheidend für die Mitochondrienhomöostase. Ein weiteres Zellorganell, an dem VCP zur Proteinhomöostase beiträgt, stellen die Ribosomen dar. Im Rahmen der Ribosomen-assoziierten Degradation ist VCP bedeutsam für die Freisetzung und Degradierung fehlerhafter Produkte der Translation. (MEYER & WEIHL, 2014; XIA et al., 2016)

Die zweite der drei Kategorien, in die sich die Funktionen von VCP einteilen lassen, umfasst die Beteiligung von VCP bei der Reaktion auf DNA-Schäden. Hierbei entfernt VCP ubiquitinierte Proteine von Chromatin im Bereich von DNA-Schäden, wie z. B. bei DNA-Doppelstrangbrüchen. (DANTUMA et al., 2014) Zusätzlich beeinflusst VCP durch die Abspaltung von Proteinen von Chromatin das Fortschreiten des Zellzyklus. (MEYER & WEIHL, 2014)

Als Drittes spielt VCP eine Rolle bei Membranfusionen und dem Vesikeltransport. (XIA et al., 2016) Es ist für die Membranfusionen, die der Wiederherstellung des Golgi-Apparats und des endoplasmatischen Retikulums nach der Mitose dienen, notwendig. (UCHIYAMA & KONDO, 2005) Darüber hinaus wurde eine Beteiligung bei der Endozytose festgestellt und eine Funktion bei der Autophagie diskutiert. (BUG & MEYER, 2012; MEYER & WEIHL, 2014; XIA et al., 2016)

Außerhalb dieser Kategorien ist VCP bei der Regulierung essentieller Signalwege beteiligt. Ein bedeutsames Beispiel ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktorfamilie Nuklearfaktor- κ B über die Degradierung eines Nuklearfaktor- κ B-Inhibitors. (MEYER & WEIHL, 2014)

Des Weiteren ist die Funktion von VCP bei Erkrankungen relevant. Es wurden Studien zu dessen Beteiligung bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen durchgeführt. So werden Mutationen im für VCP codierenden Gen mit Osteodystrophia deformans (Morbus Paget), frontotemporaler Demenz, Einschlusskörpermyositis und amyotropher Lateralsklerose assoziiert.

(JOHNSON et al., 2010; NALBANDIAN et al., 2011) Die Arbeitsgruppe um YAMAMOTO und Mitarbeiter publizierte mehrere Studien, in denen sie verschiedene Tumoren auf eine Expression und den prognostischen Wert von VCP untersuchten. Hierbei zeigten maligne endokrine Neoplasien des Pankreas eine höhere Expression von VCP als benigne (YAMAMOTO et al., 2004c). Eine höhere Expression von VCP war mit einer schlechteren Prognose bei Prostatakrebs, kolorektalen Karzinomen, Leberzell-, nicht-kleinzelligem Lungen- und Magenkarzinomen sowie bei fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Gingiva assoziiert. (YAMAMOTO et al., 2003a; 2003b; TSUJIMOTO et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2004e; 2004f; 2004d) Zusätzlich zur Prognose korrelierte die Expression von VCP beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas, beim Ösophaguskarzinom und beim follikulären Schilddrüsenkarzinom mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. (YAMAMOTO et al., 2004a; 2004b; 2005) In vitro bewirken VCP-Inhibitoren eine Ansammlung von polyubiquitinierten Proteinen, die Hemmung der endoplasmatischen Retikulum-assoziierten Degradation, die Induktion einer Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums und die Apoptose. (XIA et al., 2016) Dementsprechend wurde für einen VCP-Inhibitor bereits eine tumorhemmende Aktivität in Xenograft-Modellen verschiedener Tumoren nachgewiesen. (ANDERSON et al., 2015)

4 Unspezifische cytosolische Dipeptidase 2

Die unspezifische cytosolische Dipeptidase 2 (cytosolic non-specific dipeptidase 2, CNDP2) ist eine der beiden im Menschen vorkommenden Carnosinasen. Sie werden von den Genen CNDP1 und CNDP2 codiert. (TEUFEL et al., 2003) Funktionell handelt es sich um Dipeptidasen, die Dipeptide mit Histidin als zweiter Aminosäure hydrolysieren. Sie gehören zur M20 Familie der Metalloproteasen und benötigen Magnesiumionen für ihre Funktionalität. Generell reicht die Bedeutung dieser Metalloproteasenfamilie von der Hydrolyse später Produkte der Proteindegradation bis hin zu spezifischen Funktionen bei der Proteinreifung, der Wundheilung und der Kontrolle des Zellzyklus. (BELLIA et al., 2014) Die beiden Carnosinasen unterscheiden sich in ihrem Vorkommen innerhalb des Organismus und ihrer Substratspezifität. Während die von CNDP1 codierte Serum-Carnosinase beim Menschen vor allem im Gehirn und der Leber vorkommt, ist die von CNDP2 codierte cytoplasmatische Gewebs-Carnosinase ubiquitär in vielen Geweben des Menschen vorhanden. CNDP1 weist eine hohe Spezifität für das Dipeptid Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin) auf. (TEUFEL et al., 2003; BELLIA et al., 2014) Dieses hat weitreichende protektive Eigenschaften. Daher wird angenommen, dass die mit einer Fehlfunktion von CNDP1 einhergehenden Erkrankungen wie Diabetes, Ischämie, neurologischen Erkrankungen und Augenerkrankungen auf eine Störung der Homöostase von Carnosin zurück zu führen sind. (BELLIA et al., 2014) Von CNDP2 wird Carnosin hingegen nur bei nicht physiologischen pH-Werten um 9,5 hydrolysiert. Dafür zeigt CNDP2 bei pH-Werten um 7,5 eine breite Substratspezifität, die nicht auf Dipeptide mit Histidin als zweiter Aminosäure beschränkt ist. (TEUFEL et al., 2003) Eine erhöhte Expression von CNDP2 in der Substantia nigra wurde im Zusammenhang mit Morbus Parkinson beschrieben. (LICKER et al., 2012)

5 Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1

Das Lysosom-assoziierte Membranprotein 1 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 1, LAMP1) ist ein Typ-1-Transmembranprotein in der Membran der Lysosomen. Der sich innerhalb des lysosomalen Lumens befindende N-Terminus ist stark glykosyliert, was für die

Stabilität von LAMP1 innerhalb der lysosomalen Membran wichtig ist. Zusammen mit LAMP2 macht es etwa 50 % aller Proteine in der lysosomalen Membran aus. LAMP1 und LAMP2 stellen somit die größte Fraktion unter den Membranproteinen der Lysosomen dar. Das Vorliegen dieser beiden Proteine ist ein wichtiger Bestandteil der Definition des lysosomalen Kompartiments. (ESKELINEN, 2006)

Ursprünglich wurde angenommen, dass LAMP1 und LAMP2 eine Schutzfunktion für die lysosomale Membran gegenüber den hydrolytischen Enzymen des Lysosoms erfüllen und somit zur Erhaltung der strukturellen Integrität dieses Zellorganells beitragen. (ESKELINEN, 2006) Hierzu könnte die starke Glykosylierung dieser Proteine dienen, wodurch eine kontinuierliche Glykoproteinschicht auf der luminalen Seite der Lysosomen gebildet wird. (SCHWAKE et al., 2013) Inzwischen wird davon ausgegangen, dass LAMP1 und LAMP2 zusätzlich für die Fusion der Lysosomen mit Autophagosomen wichtig sind. Hierbei ist die Funktion von LAMP2 allerdings spezifischer, da ein Verlust von LAMP2 mit schwerwiegenden Folgen einhergeht als ein Verlust von LAMP1. (ESKELINEN, 2006) Mutationen in dem für LAMP2 codierenden Gen verursachen eine lysosomale Glykogenspeicherkrankheit (Morbus Danon). (NISHINO et al., 2000) Ein Verlust beider Lysosom-assoziierten Membranproteine geht mit einer Ansammlung autophagischer Vakuolen einher. (ESKELINEN, 2006) Neben ihrer Rolle bei der Autophagie gibt es Hinweise auf weitere Funktionen von LAMP1 und LAMP2. Sie scheinen die Motilität der Lysosomen zu regulieren und wichtig für Transportvorgänge durch die lysosomale Membran zu sein. Eine der drei Isoformen von LAMP2 erkennt cytosolische Proteine. Durch eine Beteiligung bei der Chaperon-vermittelten lysosomalen Degradation, könnten die Lysosom-assoziierten Membranproteine bei Neurodegenerationen, der Antigen-Präsentation und der Zellalterung beteiligt sein. Ferner beeinflusst der Glykosylierungsstatus von LAMP1 die lysosomale Exozytose und die Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran. (SCHWAKE et al., 2013)

6 Sorbitol-Dehydrogenase

Die Sorbitol-Dehydrogenase (SORD) katalysiert den zweiten Schritt des zweistufigen Polyolwegs. Im ersten Schritt wird Glukose durch die Aldosereduktase zu Sorbitol reduziert. Hierbei dient reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Cofaktor. Im zweiten Schritt wird Sorbitol dann durch SORD zu Fructose dehydriert. Als Cofaktor des zweiten Schritts ist Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) notwendig. (CHUNG et al., 2003; LORENZI, 2007) Eine physiologische Funktion des Polyolwegs innerhalb der Niere besteht in der Anreicherung von Sorbitol. Dieses fungiert als Osmolyt innerhalb der Nierenzellen, um bei der dauerhaft erhöhten extrazellulären Osmolarität bestehen zu können. (ZOPF et al., 2009) Der Polyolweg wird durch einen erhöhten intrazellulären Glukosespiegel aktiviert. Seit langem wird eine Beteiligung dieses Glukose-Stoffwechselwegs bei der diabetischen Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie vermutet. (LORENZI, 2007; ZOPF et al., 2009)

Eine Aktivität von SORD wurde in zahlreichen Geweben nachgewiesen. (CARR & MARKHAM, 1995) Bei kolorektalen Adenomen, frühen aber nicht bei späteren Stadien des kolorektalen Adenokarzinoms und bei Prostatakarzinomen wurde eine erhöhte Expression von SORD festgestellt. (SZABÓ et al., 2010; BESSON et al., 2011; UZOZIE et al., 2014)

7 Retinol-Dehydrogenase 11

Die Retinol-Dehydrogenase 11 (RDH11) gehört zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen. (LHOR et al., 2015) Als Oxidoreduktase spielt sie eine Rolle im Metabolismus der Retinoide. Diese fungieren sowohl als Chromophore beim Sehen als auch als Genexpressionsregulatoren. (ALBERTS et al., 2011) RDH11 kommt innerhalb der Zelle membrangebunden am endoplasmatischen Retikulum vor, wobei sich der Hauptteil des Proteins im Zytoplasma befindet. (KEDISHVILI et al., 2002; BELYAEVA et al., 2003) Für ihre enzymatische Aktivität nutzt RDH11 bevorzugt NADP⁺ bzw. NADPH als Cofaktor. Zunächst wurde sie Retinal-Reduktase 1 genannt, da von einer höheren Aktivität bei der Reduktion von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol als für die entgegengesetzte Oxidation ausgegangen wurde. (KEDISHVILI et al., 2002) HAESELEER und Mitarbeiter (2002) stellten eine zusätzliche Substratspezifität für 11-cis-Retinol fest und nahmen an, dass RDH11, wie RDH5, die Bildung von 11-cis-Retinal aus 11-cis-Retinol katalysiert. Aufgrund dessen und der Lokalisation von RDH11 im retinalen Pigmentepithel gingen sie von einer Beteiligung am visuellen Zyklus der Retinoide aus. RDH11 wird in vielen Geweben exprimiert. (KEDISHVILI et al., 2002) Neben normalen Epithelzellen der Prostata, ist auch für Prostatakarzinomzellen eine höhere Genexpression für RDH11 beschrieben. (LIN et al., 2001) Eine neuere Publikation von KUMMALUE und Mitarbeiter (2015) beschreibt außerdem eine verstärkte Proliferation und reduzierte Apoptose bei RDH11 transduzierten Zellen im Zusammenhang mit der Erythropoese.

8 Integrin alpha-V

Integrine sind sehr häufige Transmembranproteine, die außer bei Erythrozyten auf der Zelloberfläche aller tierischen Zellen vorkommen. (DE FRANCESCHI et al., 2015) Sie bestehen jeweils aus einer α und einer β Untereinheit und stellen somit Heterodimere dar. Beim Menschen sind 24 verschiedene Heterodimere bekannt, die sich durch unterschiedliche Kombination 18 verschiedener α und acht verschiedener β Untereinheiten ergeben. (ALBERTS et al., 2011)

Die Integrine fungieren überwiegend als Bindeglied zwischen dem Aktin-Cytoskelett und der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus binden manche Integrine intrazellulär an Intermediärfilamente, bzw. andere extrazellulär an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen. Durch Umschalten zwischen einer aktiven und inaktiven Konformation können die Bindungseigenschaften der Integrine dynamisch an die jeweilige Situation angepasst werden. Eine Aktivierung kann sowohl von extra- als auch von intrazellulär erfolgen. Die verschiedenen Integrine unterscheiden sich in ihren Eigenschaften und Funktionen. Zelltyp-spezifische Faktoren beeinflussen die Bindungseigenschaften der Integrine, weshalb das gleiche Integrinmolekül zum Teil je nach dem Zelltyp, in dem es exprimiert wird, spezifisch an andere Liganden bindet. Des Weiteren wirkt sich die Konzentration von zweiwertigen Kalzium- und Magnesium-Ionen in der extrazellulären Matrix auf die Affinität und Spezifität der Integrine aus. (ALBERTS et al., 2011) Zusätzlich kann eine schnelle Anpassung der Interaktionen mit der extrazellulären Matrix durch den zellulären Integrin-Transport erfolgen. Mit diesem vielschichtig regulierten Vorgang wird durch Endo- und Exozytose die Verfügbarkeit spezifischer Integrine auf der Zelloberfläche verändert. (DE FRANCESCHI et al., 2015)

Bei der Bindung der Integrine an die Proteine der extrazellulären Matrix handelt es sich um mehr als eine rein mechanische Anheftung, da Integrine zusätzlich die Signalübertragung in beide Richtungen über die Zellmembran ermöglichen. Die Integrine können über die Aktivierung

intrazellulärer Signalkaskaden fast alle Bereiche des Zellverhaltens an die extrazelluläre Umgebung anpassen. Insbesondere das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Einleitung der Apoptose, die Zellausbreitung und die Migration können so kontrolliert werden. (ALBERTS et al., 2011) Dementsprechend wird eine fehlerhafte Regulation der Integrin-Aktivität mit zahlreichen pathologischen Zuständen assoziiert, wie z. B. mit der Entstehung von Tumoren. (DE FRANCESCHI et al., 2015)

Die α Untereinheit Integrin alpha-V (ITGAV) bildet Heterodimere mit den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 8$. (WEIS & CHERESH, 2011; CONROY et al., 2016) Diese Heterodimere werden mit der Entstehung von Fibrosen (CONROY et al., 2016) sowie der Remodellierung von Gewebe bei der Wundheilung, Angiogenese und bei Tumoren assoziiert. (WEIS & CHERESH, 2011)

Das Integrin $\alpha v \beta 3$ wird überwiegend von, der Angiogenese dienenden, Endothelzellen in sich im Umbau befindenden und pathologischen Geweben exprimiert, während es in normalen, ruhenden Endothelzellen kaum vorkommt. Neben $\alpha v \beta 3$ wurde für $\alpha v \beta 5$ eine Beteiligung bei Signalwegen der Angiogenese festgestellt. Hierbei sind diese beiden Integrine allerdings in zwei unterschiedlichen Signalwegen involviert. Der Signalweg, an dem $\alpha v \beta 3$ beteiligt ist, wird durch einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor oder den Tumornekrosefaktor- α aktiviert. VEGF oder der transformierende Wachstumsfaktor- α induzieren den Signalweg, in dem $\alpha v \beta 5$ eine Rolle spielt. Ferner werden αv Integrine von neuronalen Zellen exprimiert, was für die typische Kollokalisierung von Blutgefäßen und Neuronen wichtig ist. Entsprechend reguliert von Gliazellen exprimiertes $\alpha v \beta 8$ die Gefäßentwicklung im Gehirn. (WEIS & CHERESH, 2011)

Neben anderen Integrinen wird aus der Gruppe der αv Integrine für $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ und $\alpha v \beta 6$ eine Bedeutung für das Tumorstadium und die Invasion angenommen. Hierbei werden die Integrine mit diesen Vorgängen assoziiert oder sind für diese nötig, sie selbst sind aber nicht onkogen. Durch eine Expression von Integrinen können Tumorzellen vermutlich die Angiogenese innerhalb des Tumors beeinflussen. Die Integrine können jedoch nicht nur das Wachstum, die Proliferation und die Migration der Endothelzellen, sondern auch der Tumorzellen stimulieren. Wachstumsfaktoren können zum Beispiel über $\alpha v \beta 5$ Tumorzellen zur Migration und Invasion anregen. Bestimmte Integrine werden nur gering in normalen Epithelzellen, aber stark in manchen Tumoren exprimiert. Die Expression von $\alpha v \beta 3$ korreliert mit der Tumorstadium und der Metastasierung bei Melanomen, Pankreas-, Prostata-, Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinomen. (WEIS & CHERESH, 2011)

Es gibt Ansätze, die Beteiligung der Integrine bei der Angiogenese und Tumorstadium für die Tumorstadium und Bildgebung zu nutzen. αv Integrine erkennen die Matrixproteine an die sie binden durch eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD). Synthetische Peptide, die diese Sequenz enthalten, können somit die Funktion dieser Integrine inhibieren. Außerdem können über RGD Chemotherapeutika oder Kontrastmittel gezielt in den sich neu bildenden Gefäßen von Tumoren angereichert werden. (WEIS & CHERESH, 2011)

III MATERIAL UND METHODEN

1 Patientenkollektive

Die verwendeten Kollektive wurden aus den archivierten Fällen des Instituts für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg zusammengestellt. Somit handelte es sich bei allen Proben um routinemäßig mittels Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe. Neben den im Folgenden erläuterten, spezifischen Kriterien zur Auswahl der Fälle war für die zur massenspektrometrischen Analyse vorgesehenen Fälle die Verfügbarkeit von für die Makrodissektion ausreichend großen, nekrosefreien Arealen ohne größere Blutgefäße und mit möglichst wenig Einblutungen, Entzündungszellinfiltrationen und Fibrosen von Bedeutung.

1.1 Metastasierende und nicht metastasierende klarzellige Nierenzellkarzinome

Zur Untersuchung des Proteoms klarzelliger Nierenzellkarzinome in Abhängigkeit vom Auftreten von Metastasen wurden zwölf zwischen 2004 und 2012 resezierte, primäre Tumoren analysiert. Verwendet wurden ausschließlich ccRCCs, die makroskopisch in größere Blutgefäße, nicht jedoch in die Vena cava eingebrochen waren, weder die ipsilaterale Nebenniere noch die Gerota-Faszie infiltrierten und folglich nach TNM Klassifikation als T3a klassifiziert wurden. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Die Zellen präsentierten sich je nach Fall mit zwischen ungefähr 15 bis 20 µm großen Zellkernen, welche kleine Unregelmäßigkeiten in ihrer Kontur aufwiesen oder eine offensichtlich unregelmäßige Kontur hatten. Zusammen mit entweder schon bei hundertfacher Vergrößerung prominenten Nukleolen oder mit etwas kleineren Nukleolen, die erst bei vierhundertfacher Vergrößerung erkennbar waren, wurden somit alle Fälle ursprünglich mit einem Differenzierungsgrad nach Fuhrmann von 2 oder 3 diagnostiziert. (FUHRMAN et al., 1982) Nach dieser vierstufigen Graduierung stellten sich somit alle Fälle als mäßig bis schlecht differenziert da. Des Weiteren erfolgte eine Reevaluierung für alle Fälle nach dem auf der Konsensuskonferenz der International Society of Urological Pathology (ISUP) 2012 vorgeschlagenem Graduierungssystem. Diese ebenfalls vierstufige Einteilung berücksichtigt in den ersten drei Graden lediglich die Erscheinung der Nukleolen. Sind diese bei vierhundertfacher Vergrößerung unscheinbar oder nicht sichtbar, so handelt es sich um Grad 1. Trifft dies bei hundertfacher Vergrößerung zu, treten die Nukleolen jedoch bei vierhundertfacher Vergrößerung deutlich in Erscheinung, erfolgt eine Zuordnung zu Grad 2. Bei Grad 3 sind die Nukleolen bereits bei hundertfacher Vergrößerung eindeutig zu erkennen. Grad 4 umfasst Tumoren mit rhabdoider oder sarkomatoider Differenzierung und wird außerdem für Tumoren verwendet, die Riesenzellen beinhalten oder einen extremen Kernpleomorphismus mit Chromatinverklumpungen aufweisen. (DELAHUNT et al., 2013) Auch nach dem Graduierungssystem der ISUP präsentierten sich alle zwölf ccRCC mit einem Differenzierungsgrad von 2 oder 3.

Die zwölf untersuchten ccRCC wurden für den Proteomvergleich in zwei Gruppen eingeteilt. Während bei allen sechs Fällen der Gruppe mit Metastasen zum Zeitpunkt der Nephrektomie mindestens eine Filia in den regionären Lymphknoten und bis auf einen Fall auch Fernmetastasen in der Nebenniere, Lunge, Pleura oder dem Peritoneum auftraten, konnte für die sechs Fälle der Vergleichsgruppe neben der Metastasenfreiheit ein mittleres tumorfreies Überleben von 6,28 Jahren von klinischer Seite bestätigt werden.

Neben diesem ursprünglichen Kollektiv umfasste ein erweitertes Kollektiv 33 zusätzliche primäre ccRCCs, die im Zeitraum von 2002 bis 2013 reseziert wurden. Hierbei bestand die

Gruppe, die nach klinischer Bildgebung frei von Metastasen war, aus 15 Fällen. Im Mittel belief sich die klinische Verlaufskontrolle für diese auf 6,4 Jahre und bestätigte für diesen Zeitraum ein tumorfreies Überleben. Die verbleibenden 18 Fälle wurden der Gruppe mit Metastasen zugeteilt. Bei zwei dieser Fälle bildeten die ccRCC Metastasen in die regionären Lymphknoten. Bei den anderen 16 Fällen konnten Metastasen in der Nebenniere, der Lunge, dem Gehirn, den mediastinalen Lymphknoten, der Pleura, dem Peritoneum, der Leber, der Zunge, der Milz oder dem Herzen nachgewiesen werden, wobei bei einem Teil der Fälle gleichzeitig Filiae in unterschiedlichen Lokalisationen auftraten. Während die Resektion der Metastasen bei den regionären Lymphknoten und bei zehn der Fälle mit Fernmetastasen gleichzeitig mit dem Primärtumor erfolgte, wurden in dieses erweiterte Kollektiv auch ccRCC mit aufgenommen, bei denen die Metastasenresektion innerhalb eines halben Jahres stattfand. Auch bei den 33 zusätzlichen ccRCC handelte es sich ausschließlich um T3a klassifizierte. Hierbei zeigten jedoch nicht alle einen Gefäßeinbruch, da diese Klassifizierung auch für Tumoren, die innerhalb der Gerota-Faszie das perirenale oder peripelvine Fettgewebe oder beides infiltrieren, verwendet wird. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Für die Fälle des erweiterten Kollektivs erfolgte ebenfalls ergänzend zur im Rahmen der Diagnostik eingesetzten Graduierung nach Fuhrman eine Reevaluierung des Differenzierungsgrads nach dem oben beschriebenen ISUP Graduierungssystem.

Eine Übersicht der beschriebenen Charakterisierung beider ccRCC-Kollektive ist in Tabelle III-1 zu finden. Zum Teil erfolgen die Angaben hierbei durch die TNM Klassifikation. Neben der bereits erklärten T-Kategorie zur Einteilung des Primärtumors beziehen sich die N- und M-Klassifikationen auf die Metastasen. N klassifiziert hierbei die regionären Lymphknoten. Diese sind bei Nierenzellkarzinomen die hilären, abdominalen, paraaortalen und parakavalen Lymphknoten. Bei NX ist keine Beurteilung möglich. Eine N0-, N1- oder N2-Klassifikation wird bei Nierenzellkarzinomen angewendet, wenn kein, einer oder mehr als ein regionärer Lymphknoten von einer Metastasierung betroffen ist. Äquivalent allerdings unabhängig von der Anzahl wird je nach Auftreten von Fernmetastasen M0 oder M1 klassifiziert. Bei den Lokalisationen steht PUL für die Lunge, PLE für Pleura, PER für Peritoneum, ADR für Nebenniere, HEP für die Leber, BRA für das Gehirn, LYM für nicht regionäre Lymphknoten und OTH für andere Organe. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Darüber hinaus sind zur weiteren Charakterisierung die fakultativen Deskriptoren der TNM Klassifikation L, V und Pn aufgeführt. Diese geben an, ob eine Lymphgefäß-, Venen- oder perineurale Invasion festgestellt wurde. Bei 0 liegt eine solche nicht vor, bei 1 hingegen schon. Bei einer Veneninvasion wird hierbei zusätzlich zwischen V1 für mikroskopisch und V2 für makroskopisch unterschieden. Ist keine Beurteilung möglich, wird mit X klassifiziert. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Ferner wird in Tabelle III-1 die Häufigkeit angegeben, mit der die linke oder rechte Niere in den jeweiligen Gruppen von dem ccRCC betroffen war. Neben der Geschlechterverteilung der betroffenen Patienten findet sich dort zudem das Durchschnittsalter der Gruppen.

Tabelle III-1. Charakterisierung der untersuchten zwölf ursprünglichen und 33 zusätzlichen ccRCC

		<i>ursprüngliches Kollektiv</i>		<i>erweitertes Kollektiv</i>	
		<i>ccRCC ohne Metastase</i>	<i>ccRCC mit Metastase</i>	<i>ccRCC ohne Metastase</i>	<i>ccRCC mit Metastase</i>
Gesamtzahl		6	6	15	18
T ¹	3a	6	6	15	18
N ¹	0	6	0	15	11
	1	0	2	0	2
	2	0	4	0	0
	X	0	0	0	5
M ¹	0	6	0	15	0
	1	0	5	0	16
	X	0	1	0	2
Lokalisation ¹	PUL	0	1	0	4
	PLE	0	1	0	0
	PER	0	1	0	0
	ADR	0	2	0	5
	BRA	0	0	0	2
	LYM	0	0	0	1
	PUL, PLE	0	0	0	1
	ADR, PUL	0	0	0	2
	PUL, PLE, PER, HEP, OTH	0	0	0	1
G nach Fuhrmann (FUHRMAN et al., 1982)	1	0	0	1	1
	2	4	3	13	5
	3	2	3	1	10
	4	0	0	0	2
G nach ISUP (DELAHUNT et al., 2013)	1	0	0	1	1
	2	3	0	13	10
	3	3	6	1	7
	4	0	0	0	0
V ¹	0	0	0	8	5
	1	0	0	0	4
	2	6	6	7	9
L ¹	0	6	1	15	14
	1	0	5	0	4
Pn ¹	0	6	4	15	16
	1	0	2	0	2
Metastasenresektion synchron		---	6	---	12
nach einem Monat		---	0	---	2
nach drei Monaten		---	0	---	1
nach vier Monaten		---	0	---	3
Verlaufskontrolle [Jahre]	Mittelwert	6,28	---	6,4	---
	Minimum	3,45	---	2,48	---
	Maximum	10,22	---	10,2	---
betroffene Niere	linke	3	2	9	6
	rechte	3	4	6	11
	unbekannt	0	0	0	1
Geschlecht	männlich	6	2	11	15
	weiblich	0	4	4	3
Alter	Durchschnittsalter	67	60	70	66
	Mindestalter	55	49	52	48
	höchstes Alter	76	75	87	78

¹ entsprechend TNM Klassifikation (WITTEKIND & MEYER, 2010), Erläuterung im Text

1.2 Chromophobe Nierenzellkarzinome und renale Onkozytome

In Tabelle III-2 sind die Fälle zu den ausgewählten chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen für den proteomischen Vergleich dieser beiden Entitäten charakterisiert. Dabei wird zwischen den ursprünglichen zwölf, massenspektrometrisch analysierten Fällen und den zusätzlichen 73 Fällen, die zur erweiterten Validierung der Ergebnisse mittels IHC herangezogen wurden, unterschieden. Erstere stammen aus der Zeit von 2011 bis 2013, während letztere in den Jahren zwischen 1992 bis 2015 reseziert wurden.

Alle chRCC waren auf die Niere begrenzt und somit nach TNM Klassifikation (WITTEKIND & MEYER, 2010) als T1 oder T2 klassifiziert. Die Unterteilung in T1a, T1b, T2a und T2b hängt hierbei von der Ausdehnung des auf die Niere begrenzten, primären Nierenzellkarzinoms ab. Bis einschließlich 4 cm in der größten Ausdehnung erfolgt die Klassifizierung als T1a. Tumoren, die größer aber nicht größer als 7 cm sind, zählen zur Klasse T1b. Noch größere auf die Niere begrenzte Tumoren werden der Klasse T2 zugeordnet. Hierbei liegt die Grenze für eine Unterscheidung zwischen T2a und T2b bei 10 cm. (WITTEKIND & MEYER, 2010) Um einen Vergleich zwischen den Zusammensetzungen beider Gruppen zu ermöglichen, erfolgte mit den gleichen Grenzen eine Einteilung der benignen renalen Onkozytome in Abhängigkeit von ihrer Größe. Das ursprüngliche Kollektiv umfasste für beide Gruppen ausschließlich Tumoren mit einer maximalen Ausdehnung von 7 cm. Unter den zusätzlichen Fällen waren hingegen vereinzelt auch größere Tumoren. Sofern eine Beurteilung möglich war, lag bei keinem der chRCC eine Metastasierung, eine Lymphgefäß- oder perineurale Invasion vor. Lediglich bei einem Fall des erweiterten Kollektivs konnte eine mikroskopische Veneninvasion nachgewiesen werden. Da außerdem für die RO keine vergleichbare Klassifizierung bei der Diagnosestellung erfolgte, werden in Tabelle III-2 die weiteren Angaben gemäß TNM Klassifikation auch für die chRCC nicht aufgeführt. Gemäß der aktuellen Empfehlung der ISUP chRCC nicht zu graduieren (DELAHUNT et al., 2013) unterbleibt zudem eine Angabe des Differenzierungsgrads für die chRCC. Die ursprünglichen sechs renalen Onkozytome traten alle solitär auf, somit wurden Onkozytosen ausgeschlossen. Die Auswahl für das erweiterte Kollektiv beinhaltetete hingegen auch vier Fälle mit multiplen Onkozytomen. Die Anzahl von Onkozytomen in der betroffenen Niere variierte hierbei zwischen zwei und sechs. Von diesen wurde nur ein zufällig ausgewähltes Onkozytom pro Fall in das Kollektiv mit aufgenommen.

Tabelle III-2. Charakterisierung der untersuchten renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome. Die zwölf Fälle des ursprünglichen Kollektivs wurden sowohl massenspektrometrisch als auch mittels IHC analysiert. Die 73 zusätzlichen Fälle im erweiterten Kollektiv dienten der weiteren Ergebnisvalidierung mittels IHC. (T entsprechend TNM Klassifikation (WITTEKIND & MEYER, 2010))

		<i>ursprüngliches Kollektiv</i>		<i>erweitertes Kollektiv</i>	
		<i>RO</i>	<i>chRCC</i>	<i>RO</i>	<i>chRCC</i>
Gesamtzahl		6	6	42	31
Größe/T	≤ 4 cm/1a	5	4	25	21
	≤ 7 cm/1b	1	2	15	6
	≤ 10 cm/2a	0	0	1	3
	> 10 cm/2b	0	0	1	1
Anzahl	1	6	6	38	31
	2	0	0	3	0
	6	0	0	1	0
betroffene Niere	linke	1	2	21	16
	rechte	4	3	19	12
	unbekannt	1	1	2	3
Geschlecht	männlich	3	3	24	15
	weiblich	3	3	18	16
Alter	Durchschnittsalter	66	56	64	60
	Mindestalter	57	42	42	34
	höchstes Alter	80	74	88	83

Insbesondere für den Vergleich zwischen chRCC und RO diente die IHC der zusätzlichen Absicherung der Diagnose. Hierzu wurden die Tumoren auf eine Expression von Mast- bzw. Stammzellen-Wachstumsfaktor-Rezeptor Kit, auch CD117 oder Tyrosinkinase Kit (c-kit) genannt, sowie auf eine Expression von Cytokeratin 7 (ck7), Renal cell carcinoma marker – gp200 (RCC) und Vimentin (VIM) untersucht.

Für die Unterscheidung zwischen chRCC und RO ist vor allem die Expression von ck7 entscheidend. Während die Tumorzellen des chRCC dies meist diffus membranär exprimieren, sind beim RO allenfalls vereinzelt Tumorzellen ck7 positiv. (REUTER et al., 2014; MOCH et al., 2016) Fälle, bei denen die histopathologische Diagnose und das immunhistochemische Färbeprofil für ck7 nicht übereinstimmten, wurden bei der Zusammenstellung des Kollektivs ausgeschlossen. Hiervon betroffen waren drei diffus ck7 positive, allerdings histomorphologisch als renale Onkozytome diagnostizierte Tumoren, sowie zwei Fälle, bei denen die Morphologie der eines chromophoben Nierenzellkarzinoms entsprach, die jedoch kein ck7 exprimierten.

Zusätzlich unterstützte die IHC die Abgrenzung der chromophoben Nierenzellkarzinome und der renalen Onkozytome von den klarzelligen Nierenzellkarzinomen. In Bezug auf ck7 sind letztere nur selten positiv und wenn überhaupt nur einzelne Zellen oder Zellgruppen. (REUTER et al., 2014; MOCH et al., 2016) Des Weiteren zeigen die RO und chRCC eine membranäre Färbung bei c-kit wohingegen die ccRCC dies nicht exprimieren. (REUTER et al., 2014) Im Gegensatz hierzu färben sich ccRCC bei VIM cytoplasmatisch positiv (MURPHY et al., 2004), während chRCC und RO dabei im Allgemeinen negativ sind. (MOCH et al., 2016) Nur ergänzend kann die Reaktivität für RCC zur Diskriminierung zwischen ccRCC und anderen renalen Tumoren herangezogen werden. Zwar sind mit 72-84 % die meisten ccRCC cytoplasmatisch und membranär positiv für RCC, allerdings zeigen auch andere renale Tumoren teilweise eine Reaktivität für RCC. (REUTER et al., 2014; MOCH et al., 2016) Den Anteil dieser bei den chRCC schätzen MURPHY und Mitarbeiter (2004) auf etwa 50 %, aber auch renale Onkozytome exprimieren gelegentlich RCC (MOCH et al., 2016). Zur besseren Übersicht sind die für die verschiedenen

Entitäten zu erwartenden Ergebnisse bei einer immunhistochemischen Färbung dieser Marker in Tabelle III-3 zusammengestellt.

Zur Absicherung der Diagnose wurden alle *chRCC* für die massenspektrometrische Analyse zuvor immunhistochemisch auf eine Expression von *ck7*, *RCC*, *VIM* und zusätzlich Epithelial cell adhesion molecule (*ep4* oder *EpCAM*) untersucht. Die Kriterien zur Auswahl für das Kollektiv waren Positivität für *ck7* und *ep4* sowie Negativität der Tumorzellen für *RCC* und *VIM*. Hinsichtlich *ep4* sei erwähnt, dass dieses gelegentlich auch durch renale Onkozytome exprimiert wird. (MOCH et al., 2016) Die Voraussetzungen für die Aufnahme in das Kollektiv der *RO* für die massenspektrometrische Analyse waren neben weitgehender Negativität für *ck7* die Positivität für *c-kit* in den bereits aus der ursprünglichen Diagnosestellung vorhandenen immunhistochemischen Färbungen. Sofern diese Färbungen für die *ROs* des erweiterten Kollektivs noch nicht vorhanden waren, wurden sie angefertigt. Gleiches galt für die Färbungen von *ck7*, *c-kit* und *RCC* bei den zusätzlichen *chRCC*, welche bei diesem Kollektiv zur Diagnoseabsicherung heran gezogen wurden.

Tabelle III-3. Vereinfachte Übersicht der je nach Entität zu erwartenden Ergebnisse bei den zur Diagnoseabsicherung angefertigten immunhistochemischen Färbungen

<i>Biomarker</i>	<i>ccRCC</i>	<i>chRCC</i>	<i>RO</i>
<i>c-kit</i>	negativ ²	positiv, membranär ²	positiv, membranär ²
<i>ck7</i>	negativ ^{2,3}	positiv, membranär ^{2,3}	negativ ^{2,3}
<i>RCC</i>	positiv, cytoplasmatisch und membranär ^{2,3}	negativ	negativ
<i>VIM</i>	positiv, cytoplasmatisch ³	negativ ³	negativ ³

2 Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Die Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse erfolgte nach dem in der AG Schilling des Instituts für Molekulare Medizin und Zellforschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg etablierten Protokoll für den quantitativen Proteomvergleich aus FFPE-Gewebe. (WEIßER et al., 2015) Eine schematische Zusammenfassung der Probenaufbereitung ist in Abbildung III-1 dargestellt. Alle verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte sind mit Herstellerangaben im Anhang IX.1.1 aufgelistet.

² (REUTER et al., 2014)

³ (MOCH et al., 2016)

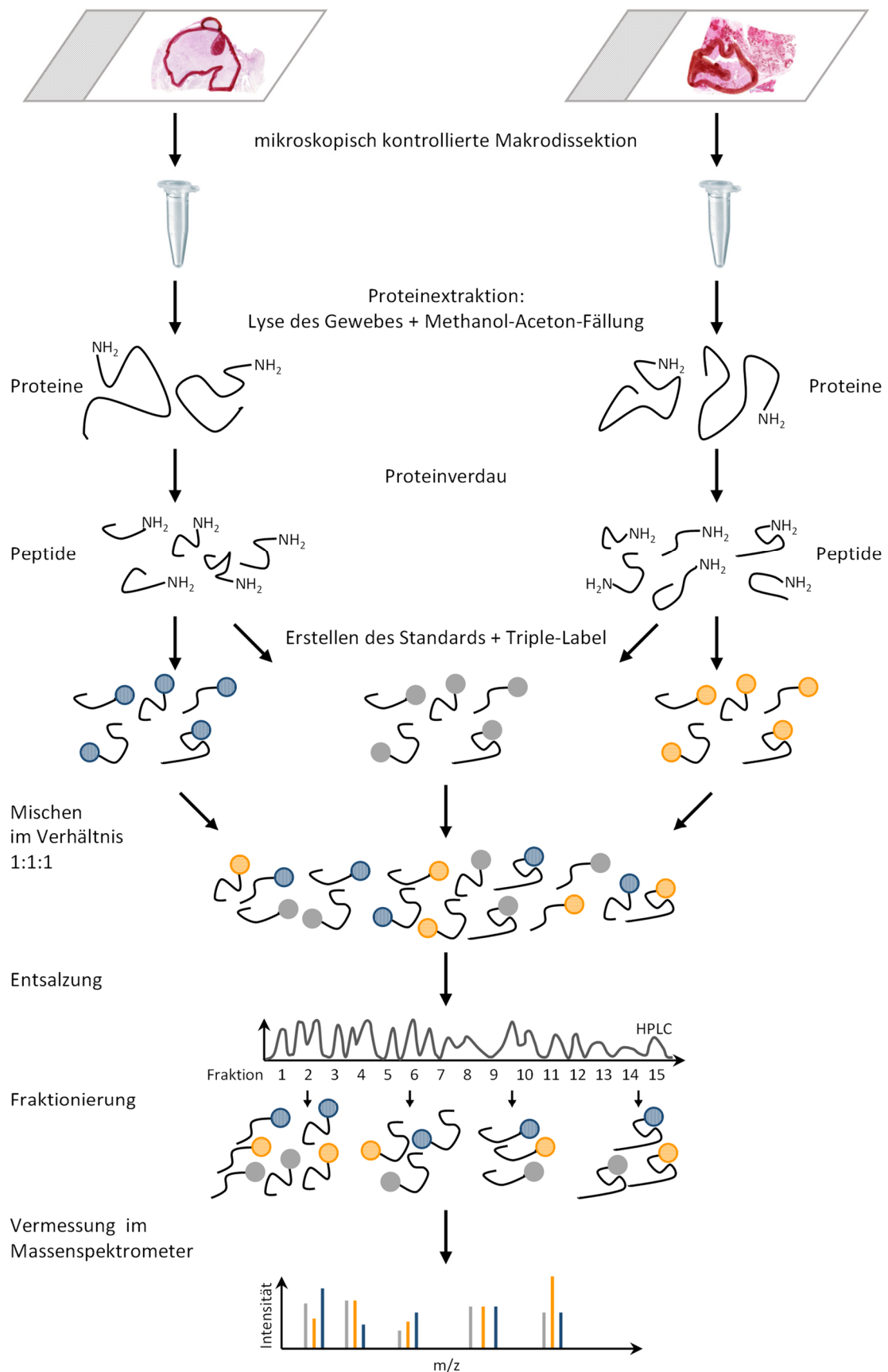


Abbildung III-1. Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für einen quantitativen Proteomvergleich. Durch Trypsin werden aus dem makrodissektierten Gewebe extrahierte Proteine zu Peptiden verdaut. Es folgt die Markierung der Proben und eines aus diesen erstellten Standards durch Dimethylierung mittels verschiedener, stabiler Formaldehydisotope. Die gemischten Proben werden fraktioniert und im Massenspektrometer vermessen.

2.1 Mikroskopisch kontrollierte Makrodissektion

Anhand von HE gefärbten Schnitten (siehe Kapitel III.5) erfolgte die Auswahl der zu analysierenden Tumorareale. Bei Betrachtung der Schnitte unter dem Mikroskop wurden Tumorareale ohne größere Anteile von Nekrosen und unter Ausschluss von größeren Blutgefäßen, Fibrosen, Einblutungen und Entzündungszellinfiltraten mit einem Folienstift markiert. Ein Beispiel hierzu ist in Abbildung III-2 gezeigt.



Abbildung III-2. Beispiel für ein zur Makrodissektion ausgewähltes Tumorareal. Zu sehen sind zwei 2 μ m dicke Serienschritte eines chromophoben Nierenzellkarzinoms. Am linken Schnitt sind Fibrosen und größere Blutgefäße zu erkennen, die bei dem unter dem Mikroskop eingezeichneten Areal für die Makrodissektion auf dem rechten Schnitt ausgeschlossen wurden. (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 0,2 cm.)

Von jedem ausgewählten Fall wurden, wie in Kapitel III.5 beschrieben, 10 μ m bzw. teilweise 5 μ m dicke Schnitte von dem Paraffinblock angefertigt, in dem sich das größte zusammenhängende Tumorareal befand. Die Anzahl der Schnitte pro Fall richtete sich nach der Größe des markierten Areals, je kleiner dieses war, desto mehr Schnitte wurden verwendet. Nach Entparaffinierung wie in Kapitel III.6.1 beschrieben, erfolgte eine Makrodissektion der ungefärbten, feuchten Gewebeschnitte unter Zuhilfenahme der markierten HE-Schnitte. Hierzu wurden mit einem Skalpell die ausgewählten Tumorareale jeweils in einem Stück von dem übrigen Gewebe getrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Fall überführt. Erfolgte die weitere Probenbearbeitung am gleichen Tag, so wurden die Proben bis zu dieser auf Eis gestellt, ansonsten wurden sie über Nacht bei -20 °C eingefroren.

2.2 Proteinextraktion

Nach Zugabe von je 250 μ l Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang IX.2) und Versiegeln der Reaktionsgefäße fand die Lyse des formalinfixierten Tumorgewebes in einem Heizblock bei 95 °C und unter Schütteln bei 750 rpm für eine Stunde statt. Erst nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur erfolgte eine Separation unlöslicher Gewebeanteile durch Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 10 Minuten. Die gelösten Proteine wurden im Anschluss in Form des Überstandes in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Vor einer Fällung der Proteine für deren Aufreinigung wurden vorhandene Disulfidbrücken durch Reduktion und Alkylierung der Cysteinreste aufgelöst bzw. deren Bildung verhindert. Dies erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Dithiothreitol und im Anschluss an eine dreißigminütige Inkubation bei 37 °C von 50 mM Iodacetamid. Hier folgte eine viertelstündige Inkubation bei 37 °C bevor durch erneute Zugabe der gleichen Menge Dithiothreitol wie beim ersten Mal und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C unverbrauchtes Iodacetamid abgefangen wurde.

Die Zugabe von 250 µl vorgekühltem Methanol und von 2250 µl vorgekühltem Aceton sowie die anschließende zweistündige Inkubation bei -80 °C verursachte die Ausfällung der gelösten Proteine. Diese wurden durch vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes nach einstündigem Zentrifugieren bei 4 500 rpm und 4 °C isoliert. Das so erhaltene Pellet wurde dreimal mit je 1 ml Methanol gewaschen, wobei zwischen Zugabe und Abpipettieren des Methanols jeweils 10 Minuten bei 4 500 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Die Resuspension des so gereinigten Pellets gelang durch Zugabe von 200 – 400 µl 100 mM Natronlauge je nach Pelletgröße und der Anwendung eines gekühlten Ultraschallbads bis zur vollständigen Auflösung. Im Anschluss erfolgte die Neutralisation des pH-Wertes durch Zugabe von 200 mM HEPES freie Säure, wobei das Erreichen eines pH-Wertes von 7,5 – 8 mittels pH-Papier geprüft wurde.

Durch erneutes Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 10 Minuten und Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß fand eine Entfernung unlöslicher Teilchen statt. Des Weiteren wurden viermal 5 µl in neue Reaktionsgefäße überführt, um wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben eine Proteinkonzentrationsbestimmung sowohl mittels Bicinchoninsäuretest als auch mittels Bradford-Test jeweils in Duplikaten durchführen zu können. Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch diese beiden, unterschiedlichen Assays verhindert eine Fehlinterpretation des Ergebnisses durch bei der Aufreinigung unvollständig entfernte Bestandteile aus dem Lysepuffer. Während Reduktionsmittel wie Dithiothreitol kaum einen Einfluss auf den Bradford-Test nehmen (SPECTOR, 1978), im Bicinchoninsäuretest hingegen zu einer Überschätzung der Proteinkonzentration führen (HILL & STRAKA, 1988), nimmt die Proteinsensitivität des Bradford-Tests durch sehr gering konzentrierte Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat ab (FRIEDENAUER & BERLET, 1989), welche wiederum den Bicinchoninsäuretest kaum beeinflussen (SMITH et al., 1985). Somit kann sowohl eine Verschleppung von Dithiothreitol als auch von geringen Mengen Natriumdodecylsulfat anhand der geringeren Proteinkonzentration laut Bradford-Test im Vergleich zum Bicinchoninsäuretest detektiert werden. Höhere Konzentrationen an Natriumdodecylsulfat würden hingegen eine Überschätzung der Proteinkonzentration (COMPTON & JONES, 1985) und somit einen höheren Wert im Bradford-Test im Vergleich zu dem Resultat aus dem gegenüber Detergenzien unempfindlichen Bicinchoninsäuretest bewirken.

2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Wie im vorangehenden Abschnitt erläutert, fanden zwei Verfahren bei der Proteinkonzentrationsbestimmung Anwendung. Bei beiden Verfahren diente eine Verdünnungsreihe der Erzeugung einer Kalibriergeraden. Hierzu wurde das initial in einer Konzentration von 2 mg/ml vorliegende bovine Serumalbumin für die nächste Verdünnungsstufe jeweils 1:1 mit destilliertem Wasser gemischt und so bis zu einer Konzentration von 0,0625 mg/ml verdünnt. Im Anschluss wurden von jeder Konzentrationsstufe 5 µl als Standard in jeweils ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein zunächst leeres Reaktionsgefäß fand im Folgenden Verwendung zur Erzeugung eines Nullwertes.

Von jeder Probe wurden Duplikate oder Triplikate von je 5 µl in separate Reaktionsgefäße pipettiert. Der jeweilige Assay wurde für diese zusammen mit den Standards und dem Reaktionsgefäß für den Nullwert wie folgt durchgeführt.

2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuretest

Für den Bicinchoninsäuretest erfolgte zunächst die Herstellung des Bicinchoninsäuretest Reagenz aus den Lösungen A und B im Volumenverhältnis 50:1. Von diesem wurden nun je

100 µl zu jeder Probe, jeden Standard und in das leere Reaktionsgefäß pipettiert und durch vortexen mit dem Inhalt darin gemischt. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 60 °C über 30 Minuten. Dabei kommt es aufgrund des alkalischen Milieus zur sogenannten Biuretreaktion bei der die Peptidbindungen der Proteine einen Komplex mit den in Lösung B enthaltenen Cu^{2+} -Ionen bilden. Innerhalb dieses Komplexes werden die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert. Je zwei Moleküle der Bicinchoninsäure aus Lösung A bilden wiederum einen spezifischen, stabilen und löslichen Komplex mit einem der gebildeten Cu^+ -Ionen. Dieser hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm. Da die Menge reduzierter Kupferionen proportional zur Proteinmenge ist, hängt auch die Intensität der Absorption bei dieser Wellenlänge von der Proteinkonzentration ab. (SMITH et al., 1985) Sichtbar wird dies durch einen Farbumschlag von Hellgrün zu unterschiedlich dunklem Lila.

Diese Farbveränderung wurde durch Vermessen mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert. Dazu wurden die Inhalte aus den Reaktionsgefäßen in eine 96-Wellplatte überführt. Über die bekannten Konzentrationen der Standards und unter Verwendung des Nullwerts erfolgte mithilfe der Software SOFTmaxPro 4.0 (Life Science Edition, Molecular Devices Corporation) die Berechnung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test

Auch für den Bradford-Test wurde zuerst das Bradford-Reagenz angesetzt. Dies erfolgte durch Verdünnen der fünffach konzentrierten Stammlösung mit destilliertem Wasser auf die einfache Konzentration. Mit Ausnahme der Inkubation im Wasserbad, die beim Bradford-Test entfällt, wurde ansonsten wie beim Bicinchoninsäuretest verfahren. Die Quantifizierung fand bei einer Wellenlänge von 595 nm im UV-Spektrometer statt. Diese ergibt sich als Kompromiss aus dem Absorptionsmaximum bei 620 nm des Protein-Farbstoff-Komplexes bestehend aus Protein und der anionischen, blauen Form des im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die an Protein bindet und der Vermeidung zu starker Interferenzen mit der grünen, neutralen Form. Letztere dominiert neben der roten, kationischen Form bei Abwesenheit von Protein durch den niedrigen pH-Wert des Reagenz. Das Absorptionsmaximum der roten, kationischen Form liegt bei 470 nm, das der grünen, neutralen Form bei 650 nm und für die ungebundene blaue, anionische Form bei 590 nm. (CHIAL et al., 1993) Die Reaktion verläuft aufgrund der Abnahme des ungebundenen Farbstoffes nicht ganz linear zur Proteinkonzentration. Mithilfe der Standards ist dennoch eine ausreichend genaue Proteinkonzentrationsbestimmung möglich (BRADFORD, 1976).

2.4 Proteinverdau

Die extrahierten Proteine wurden mittels Trypsin verdaut. Die hierdurch erhaltenen Peptide liegen im idealen Messbereich des verwendeten Massenspektrometers. Bei der Trypsinierung werden alle Proteine spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten, wodurch die aus einem bestimmten Protein entstehenden Peptide determiniert sind. Dies ist für die Identifizierung bei der massenspektrometrischen Analyse essentiell.

Vor dem Verdau der Proteine mittels Trypsin erfolgte für jede Probe die Berechnung der Menge an extrahiertem Gesamtprotein aus der ermittelten Proteinkonzentration und dem errechneten Probenvolumen. Um später eine Kontrolle des Verdaus durch einen Vergleich mit dem ursprünglichen Protein zu ermöglichen, wurde von jeder Probe 2,5 µg Protein in einem

neuen Reaktionsgefäß eingefroren. Die Trypsinierung fand bei 37 °C für 16 Stunden statt. Hierzu wurde Trypsin in einem Massenverhältnis zum Gesamtprotein von 1:100 zugegeben.

Am nächsten Tag erfolgte die bereits erwähnte Verdauungskontrolle durch einen Vergleich zwischen der unverdauten und der verdauten Probe mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden erneut 2,5 µg Protein aus jeder Probe entnommen und zusammen mit den aufgetauten, unverdauten Proben vom Vortag jeweils mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl Ladepuffer und Inkubation bei 95 °C im Heizblock für mindestens fünf Minuten folgte das Laden der Proben und eines Markers auf die in einer mit Laufpuffer befüllten Gelelektrophoresekommer befindlichen 12,5-prozentigen Polyacrylamidgele (Herstellung siehe Anhang IX.3). Die Gelelektrophorese fand bei einer angelegten Spannung von 150 V für circa 60 Minuten statt. Im Anschluss wurden die im Gel aufgetrennten Proteine und Peptide nach dem in Tabelle III-4 aufgeführten Protokoll mit Silbernitrat angefärbt. Genauere Angaben zu den hierbei eingesetzten Reagenzien sind dem Anhang IX.4 zu entnehmen. Während den Inkubationszeiten befanden sich die Gele mit dem jeweiligen Reagenz in einer viereckigen Petrischale auf einem Schüttler. Der Verdau war erfolgreich, wenn wie bei dem Beispiel in Abbildung III-3 bei den Proben nach dem Verdau nicht wie vor dem Verdau ein über die verschiedenen Massen kontinuierliches Spektrum an gefärbten Proteinen, sondern ausschließlich die Peptide im Bereich der niedrigen Massen zu sehen sind.

Tabelle III-4. Protokoll für die Silbernitratfärbung der Polyacrylamidgele zur Verdauungskontrolle

<i>Reagenz</i>	<i>Inkubationszeit [min]</i>
Fixationspuffer	30
einmaliges Waschen mit Leitungswasser	keine
Yellow Mix	5
dreimaliges Waschen mit Leitungswasser	je 10
Silbernitrat	11
zweimaliges Waschen mit Leitungswasser	keine
zweimaliges Waschen mit Natriumcarbonat	keine
0,1 % Formaldehyd in Natriumcarbonat	ca. 3, nach gewünschter Färbeintensität
Essigsäure	unbegrenzt

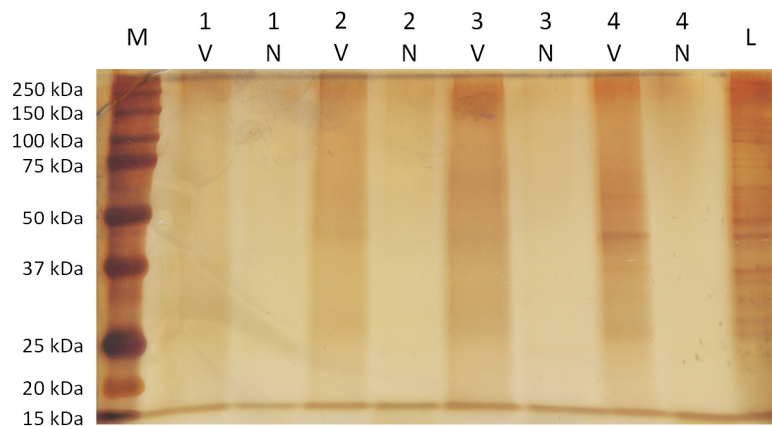


Abbildung III-3. Verdauungskontrolle. Vor und nach dem Verdau wurde von den Proben je 2,5 µg Protein entnommen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei den Proben vor dem Verdau (V) ist ein kontinuierliches Spektrum an gefärbten Proteinen zu sehen, während die Peptide nach dem erfolgreichen Verdau (N) ausschließlich durch eine Bande an der Lauffront zu erkennen sind. (M: kommerzieller Marker, L: 2,5 µg Zellysate als Ladekontrolle)

2.5 Erstellen eines Standards

Um eine relative Quantifizierung der bei der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Proteine zu ermöglichen, wurden die verdauten Proben markiert. Das genaue Verfahren ist im nächsten Abschnitt (siehe Kapitel III.2.6) beschrieben. Allerdings erlaubt diese Methode ausschließlich eine relative Quantifizierung zwischen den gemeinsam im Massenspektrometer vermessenen Proben. Damit unabhängig von einer zufälligen Probenpaarung alle Proben eines Kollektivs miteinander verglichen werden können, ist bei diesem Verfahren die Verwendung eines Standards erforderlich.

Sowohl für das Kollektiv der klarzelligen Nierenzellkarzinome mit und ohne Metastasen als auch für den Vergleich zwischen chromophobem Nierenzellkarzinom und Onkozytom wurde ein eigener Standard generiert. Hierzu wurde von den einzelnen Proben des jeweiligen Kollektivs Protein entnommen. Bei der Zusammensetzung der Standards war entscheidend, dass beide zu vergleichenden Gruppen gleich viel Protein zum Standard beitrugen. Da die extrahierte Proteinmenge zwischen den Fällen variierte, reichte diese nicht bei jeder Probe aus, um neben der eigentlichen Analyse einen Teil des Proteins für den Standard zu verwenden. Aus diesem Grund beinhaltete der Standard nicht jede Probe und insbesondere bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen nicht gleich viel von jeder Probe. Die genauen Zusammensetzungen der Standards sind jeweils Teil A der Abbildung III-4 und Abbildung III-5 zu entnehmen.

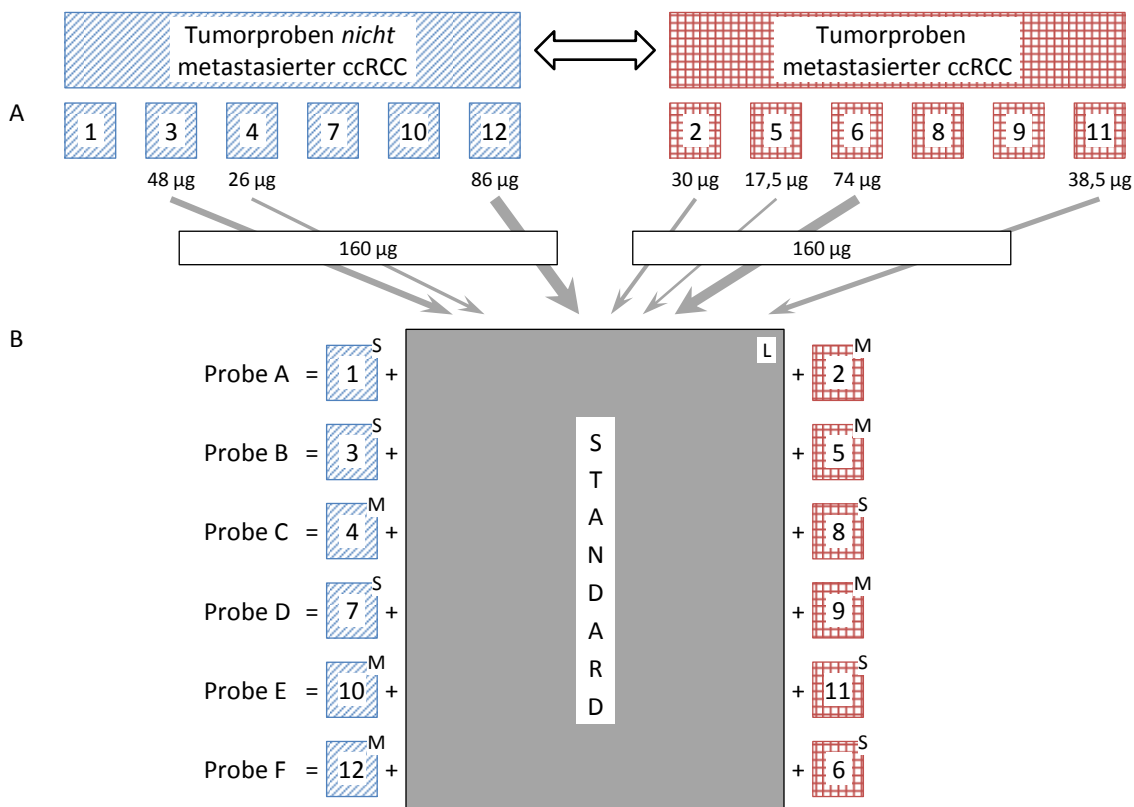


Abbildung III-4. Zusammensetzung des Standards und der massenspektrometrisch analysierten Proben für den Vergleich zwischen je sechs metastasierenden und nicht metastasierenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Zur Verblindung wurden die zwölf Patientenproben zufällig und gruppenunabhängig durchnummeriert. A: Der Standard setzte sich gleichmäßig aus beiden Gruppen zusammen, wobei die verschiedenen Patientenproben einen unterschiedlich großen Beitrag leisteten. B: Je eine Tumorprobe eines metastasierenden und eines nicht metastasierenden ccRCC mit unterschiedlichen Labeln (siehe Kapitel III.2.6) und ein leicht gelabelter Teil des Standards wurden im Verhältnis 1:1:1 zu den Proben A bis F zusammen gemischt. (L = leicht gelabelt, M = medium gelabelt, S = schwer gelabelt)

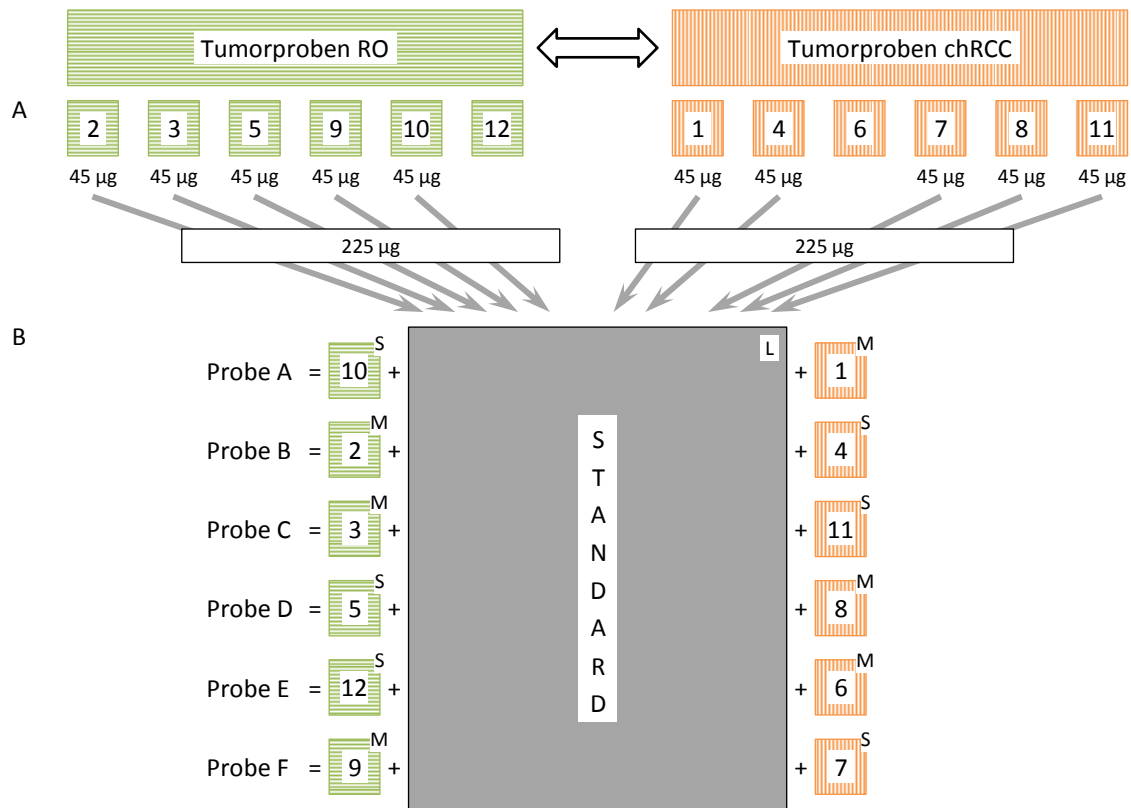


Abbildung III-5. Zusammensetzung des Standards und der massenspektrometrisch analysierten Proben für den Vergleich zwischen je sechs renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. Zur Verblindung wurden die zwölf Patientenproben zufällig und gruppenunabhängig durchnummeriert. A: Der Standard setzte sich gleichmäßig aus beiden Gruppen zusammen, wobei bis auf Nummer 6 und 12 alle Patientenproben einen gleich großen Beitrag leisteten. B: Je eine Tumorprobe eines RO und eines chRCC mit unterschiedlichen Labels (siehe Kapitel III.2.6) und ein leicht gelabelter Teil des Standards wurden im Verhältnis 1:1:1 zu den Proben A bis F zusammen gemischt. (L = leicht gelabelt, M = medium gelabelt, S = schwer gelabelt)

2.6 Isotopisches Markieren

Wie bereits erwähnt wurden die Peptide für die spätere Quantifizierung mittels eines sogenannten Labels markiert. Dadurch kann später bei der Datenanalyse nachvollzogen werden, aus welcher der gemeinsam vermessenen Proben das jeweilige Peptid stammte. Zunächst wurde erneut wie in Kapitel III.2.3.1 beschrieben mittels Bicinchoninsäuretest das vorhandene Gesamtprotein pro Probe in Triplikaten bestimmt, um im Anschluss an das Labeln die Proben im Massenverhältnis 1:1 mischen zu können. Dieses feste Mischungsverhältnis ermöglicht eine spätere Quantifizierung. Die von jeder Probe zu entnehmende Proteinmenge richtete sich nach der geringsten vorhandenen Gesamtproteinmenge. Sowohl für die klarzelligen Nierenzellkarzinome als auch für den Vergleich zwischen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen betrug dieses 35 µg. Neben der Entnahme dieser Proteinmenge für die weitere Probenaufbereitung wurde wie in Kapitel III.2.5 beschrieben ein Standard aus den Proben zusammen pipettiert, durch vortexen gemischt und in 35 µg Protein umfassende Portionen aufgeteilt. Im Anschluss fand sowohl für die Proben als auch für die Standards eine Wiederholung der Reduktion und Alkylierung der Cysteinreste statt. Äquivalent zu dem in Kapitel III.2.2 beschriebenen Vorgehen vor der Proteinfällung erfolgte hierzu nacheinander die Zugabe von 10 mM Dithiothreitol, 50 mM Iodacetamid und nochmals 10 mM Dithiothreitol. Zwischen dem Hinzufügen der verschiedenen Reagenzien inkubierten die Proben jeweils für 15 Minuten bei 37 °C.

Die eigentliche Markierung der Proben gelang durch die Dimethylierung der Peptide mittels verschieden schwerer, stabiler Formaldehydisotopen. Bei der zugrundeliegenden chemischen Reaktion handelt es sich um eine reduktive Aminierung. Die hierbei aus der Reaktion von Formaldehyd mit dem N-terminus der Peptide oder der ϵ -Aminogruppe vorhandener Lysinreste entstehenden Schiffchen Basen werden durch die Zugabe von Natriumcyanoborhydrid oder -deuterid zusätzlich reduziert. Somit bilden sich aus den primären Aminen der Peptide reaktionsfreudigere sekundäre Amine, die mit einem weiteren Formaldehyd zu einer Dimethylamino-Gruppe reagieren. (HSU et al., 2003; GUO et al., 2007) Durch die Verwendung von drei verschiedenen Formaldehydisotopen in Kombination mit Natriumcyanoborhydrid oder -deuterid ist es, wie Abbildung III-6 veranschaulicht, auf diese Weise möglich eine Massenadduktion von 28, 32 oder 36 Da pro N-terminus und Lysinrest zu erzielen. (BOERSEMA et al., 2008; 2009) Durch dieses Triple-Label können somit drei verschiedene Proben miteinander gemischt und gemeinsam im Massenspektrometer vermessen werden. Im Anschluss ist eine Zuordnung der einzelnen Peptide zu den Proben am resultierenden Massenspektrum durch den definierten Massenunterschied von je 4 Da zwischen den drei Labeln bei ansonsten identischen Peptiden möglich.

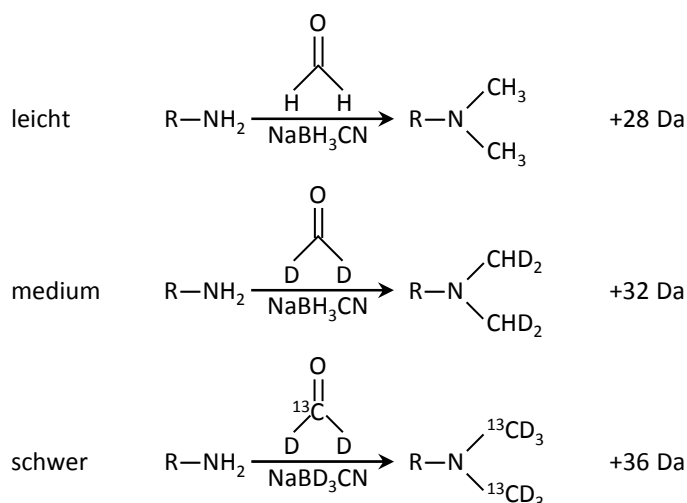


Abbildung III-6. Schematische Darstellung des Triple-Labels. Die primären Amine der Peptide werden, in Anwesenheit von Natriumcyanoborhydrid, durch Formaldehyd dimethyliert. Durch die Kombination verschiedener stabiler Formaldehydisotopen mit Natriumcyanoborhydrid oder -deuterid findet hierbei eine Massenadduktion von 28, 32 oder 36 Da statt. (R: Peptid-Rest) (BOERSEMA et al., 2008; 2009)

Konkret erfolgte dieser Markierungsschritt durch die Zugabe von 40 mM des entsprechenden Formaldehyds und 40 mM Natriumcyanoborhydrid bzw. -deuterid. Die Standards wurden hierbei jeweils leicht gelabelt. Um eine Beeinflussung z. B. durch nicht ganz reine Isotope, des Ergebnisses durch unterschiedliches Labeln zu minimieren, wurde jeweils die Hälfte einer Gruppe medium und die andere Hälfte schwer gelabelt. Das Vorliegen des für diesen Schritt optimalen pH-Wertes von 7,5–8 wurde vorher mittels pH-Papier geprüft. Nach Zugabe des Formaldehyds und des Natriumcyanoborhydrids bzw. -deuterids folgte eine Inkubation der Proben und Standards bei 37 °C für eine Stunde. Nach wiederholter Zugabe der gleichen Menge des entsprechenden Formaldehyds und Natriumcyanoborhydrids bzw. -deuterids wurden die Proben und Standards für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 20 mM Glycin und mindestens fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur am nächsten Tag wurde überschüssiges Formaldehyd abgefangen und hierdurch unge-

wolltes Labeln nach dem Mischen der verschiedenen Proben verhindert. Das bereits weiter oben beschriebene Angleichen der Proteinmengen aller Proben und der Standards auf 35 µg gewährleistete ein Mischungsverhältnis bezogen auf die Proteinmenge von 1:1:1 durch Vereinigen der gesamten Volumina. Vereinigt wurden jeweils eine medium markierte Probe der einen mit einer schwer markierten Probe der zu vergleichenden anderen Gruppe und einem leicht gelabelten, aus Protein beider Gruppen bestehenden Standard. Im Detail wird dies für die klarzelligen Nierenzellkarzinome in Teil B der Abbildung III-4 (siehe Seite 34) und für die renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome in Teil B der Abbildung III-5 (siehe Seite 35) veranschaulicht.

2.7 Entsalzung und Fraktionierung

Die Proben wurden vor der Vermessung im Massenspektrometer durch Fraktionierung unterteilt. Dies ermöglicht eine größere Proteinabdeckung der hochkomplexen Proteome der analysierten Proben.

2.7.1 Entsalzung mittels Umkehrphasen-Festphasenextraktion

Für die verwendete Fraktionierung ist eine vorherige Entsalzung der Proben notwendig. Hierfür kamen Sep-Pak-Säulchen mit einer Kapazität von bis zu 500 µg Protein zum Einsatz. Diese kommerziell erhältlichen Säulchen dienen der Umkehrphasen-Festphasenextraktion und sind mit fest gebundenem Octadecylsilan bepackt. Die über Silane gebundenen C18-Ketten fungieren wie bei der Reversed-Phase-Chromatographie als hydrophobe, stationäre Phase an die die Peptide binden, während polare Salze die Säulchen ungehindert passieren können.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Proben für diesen Schritt, indem diese mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 ml gebracht wurden und in einer Konzentration von 0,3 % Trifluoressigsäure hinzugegeben wurde. Zur Bestätigung eines pH-Wertes kleiner 3 fand pH-Papier Anwendung.

Bei der Verwendung der Sep-Pak-Säulchen ist ein zügiges Vorgehen von Bedeutung, um ein Austrocknen zwischen den Schritten zu vermeiden. Das jeweilige Agens wurde auf die Säule pipettiert und mittels einer durch einen Adapter an die Säule angepassten Pipettierhilfe durch diese gedrückt. Auf diese Weise wurde nacheinander zunächst zum Waschen 1 ml 80%iges Acetonitril und für die Equilibrierung zweimal je 1 ml 0,1%ige Trifluoressigsäure über jedes Säulchen gegeben. Es folgte das Laden der Probe auf gleicher Art, wobei der Durchfluss in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und ein zweites Mal auf die entsprechende Säule gegeben wurde. Auch hier wurde der Durchfluss gesammelt und zur Sicherheit aufgehoben. Die nun mit Peptiden beladenen Säulchen wurden dreimal mit je 1 ml 0,1%ige Trifluoressigsäure gewaschen, bevor die gebundenen Peptide mit 1,4 ml 80%iges Acetonitril eluiert wurden.

Der letzte Schritt, die Elution mit Acetonitril, erfolgte aufgrund des begrenzten Fassungsvermögens der Säulchen in zwei Schritten. Um eine möglichst vollständige Elution aller gebundenen Peptide zu gewährleisten, wurde das Acetonitril sehr langsam durch die Säule gedrückt und inkubierte zwischenzeitlich für eine Minute auf der Säule. Das gesamte Eluat wurde in einem speziell gegenüber Lösungsmittel robustem Eppendorfgefäß aufgefangen.

Im Anschluss diente die Verwendung eines Vakuumkonzentrators für etwa eineinhalb Stunden bei 45 °C bis zu einem Probenvolumen von ca. 100 µl nicht nur der Aufkonzentrierung der Proben, sondern auch der vollständigen Elimination des Acetonitrils.

Die für die folgende Fraktionierung der Proben zu verwendende Methode ist von der vorhandenen Proteinmenge abhängig. Aus diesem Grund fand eine erneute Abschätzung des vor-

handenen Gesamtproteins je Probe in Duplikaten mit Hilfe des Bicinchoninsäuretests (siehe Kapitel III.2.3.1) statt.

2.7.2 Fraktionierung mittels HPLC

Im Falle der Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome lag zu diesem Zeitpunkt bei allen Proben die Mindestmenge von 70–100 µg Protein vor, wodurch eine Fraktionierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden konnte. Hierbei fungierte eine Polysulfoethyl-Säule als starker Kationenaustauscher, an den die durch Ansäuern der Proben positiv geladenen Peptide zunächst binden. Durch graduelle Erhöhung der Salzkonzentration im Eluent werden sie in Abhängigkeit von ihrer Ladung zu unterschiedlichen Zeitpunkten wieder gelöst.

Das Ansäuern erfolgte durch Auffüllen der Proben mit 200–250 µl HPLC-Puffer A (Zusammensetzung siehe Anhang IX.2) auf ein Volumen von 300 µl. Fünfminütiges Zentrifugieren bei 14 000 rpm vor dem Aufziehen der Probe mit einer Glasspritze verhinderte den ungewollten Eintrag unlöslicher Substanzen auf die Säule. Im Anschluss wurde die Probe auf die zuvor gewaschene Säule injiziert. Diese wurde zu Beginn ausschließlich mit HPLC-Puffer A gespült. Während des über zwei Stunden laufenden Gradienten fand jedoch automatisch eine kontinuierliche Erhöhung des Anteils an Kaliumchlorid-haltigen HPLC-Puffer B (Zusammensetzung siehe Anhang IX.2) statt. Dabei betrug die Flussrate 0,5 ml/min. Das Eluat wurde durch einen Fraktionsammler aufgefangen und hierbei nach jeweils 1,5 Minuten in Fraktionen unterteilt.

Im Anschluss wurden anhand des Chromatogramms die peptidhaltigen Fraktionen ermittelt und ein Vakuumkonzentrator fand zur Reduzierung des Volumens der einzelnen Fraktionen auf ca. 100 µl bei 45 °C Anwendung. Neben der Aufkonzentrierung diente dies auch hier dem Verdampfen des durch die HPLC-Puffer in die Proben eingetragenen Acetonitrils. Mit dem Ziel Fraktionen mit für die massenspektrometrische Vermessung ausreichendem Peptidgehalt zu erhalten, wurden benachbarte Fraktionen teilweise vereinigt, wodurch je nach abzuschätzender Peptidmenge 6–8 Fraktionen pro Probe entstanden. Wie beschrieben erfolgte erneut die Reduktion des Volumens auf 100 µl.

2.7.3 Fraktionierung mittels StageTips

Die Bestimmung des Peptidgehalts ergab bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen nicht für alle Proben eine für die Fraktionierung durch die HPLC ausreichende Peptidmenge. Aus diesem Grund fand die Fraktionierung aller Proben für dieses Kollektiv über eine Festphasenextraktion mittels selbstgepackter Micro-Säulen statt. Als Säulenmaterial kam hierfür ein kommerziell, in Scheibenform erhältlicher Kationenaustauscher bestehend aus einem mit Sulfonsäure modifizierten Poly(styren-divinylbenzen) Copolymer zum Einsatz. Dieser wurde in dem von RAPPILBER und Mitarbeiter (2003) beschriebenen und später (2007) in zahlreichen Protokollen zur Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie genutzten stop-and-go-extraction tips (StageTips) Verfahren verwendet. Dabei wird mittels einer stumpfen Kanüle Material aus der Kationenaustauscher-Scheibe gestanzt und durch Verschieben eines zur Kanüle passenden Kolbens in eine herkömmliche 200 µl Pipettenspitze appliziert. Um die Bindekapazität der hergestellten Micro-Säule auf 50 µg zu erhöhen, wurden auf diese Weise insgesamt fünf Minischeiben übereinander in die Pipettenspitze verbracht. Das abgeschnittene und verkehrt herum auf die Spitze aufgebrachte breite Ende der Pipettenspitze diente als Halterung für die StageTips. Dadurch war es möglich diese ohne Kontakt zum späteren Eluat in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu platzieren.

Anhand der zuvor im Bicinchoninsäuretest ermittelten Proteinkonzentration wurde für jede Probe das nötige Volumen ermittelt, um 50 µg Protein zu laden und dieses mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. In Kapitel III.2.7.2 wurde bereits beschrieben, dass für die Fraktionierung mit Hilfe eines starken Kationenaustauschers eine Ansäuerung der Proben erforderlich ist. Bei der Fraktionierung mittels StageTips erfolgte dies durch die Zugabe von Trifluoressigsäure in einer Konzentration von 0,3 % und wurde anschließend mit pH-Papier geprüft.

Nach diesen Vorbereitungen bestand jeder der nachfolgenden Schritte aus dem Pipettieren des Agens auf die Säule gefolgt von kurzem Zentrifugieren. Der Luftdruck bei letzterem diente dazu die Flüssigkeiten durch die Säule zu drücken. Ein zügiges Arbeiten zwischen den Schritten ist ratsam, um ein Austrocknen der Säulen zu verhindern.

Zum Säubern wurden zunächst 20 µl Methanol auf jede Säule gegeben und für eine Minute bei 4 000 rcf zentrifugiert. Es folgte die Equilibrierung durch je 20 µl Austauscher-Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang IX.5), 500 mM Ammoniumacetatlösung (Zusammensetzung siehe Anhang IX.5) und erneut Austauscher-Ladepuffer mit einminütigem Zentrifugieren bei 4 000 rcf zwischen jedem Agens. Auf die so vorbereitete Säule wurde im nächsten Schritt die Probe geladen und der Durchfluss in einem neuen, lösungsmittelbeständigen Eppendorfggefäß während des Zentrifugierens bei 1 000 rcf für fünf Minuten gesammelt und verwahrt. Die eigentliche Fraktionierung erfolgte über eine stufenweise Elution durch sechs verschiedene Eluenten mit zunehmendem Ammoniumacetatgehalt. Hierzu wurden nacheinander je 20 µl einer 20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM und 500 mM Ammoniumacetatlösung (genaue Zusammensetzung siehe Anhang IX.5) auf die Säulen pipettiert, zwischen jedem Eluenten für drei Minuten bei 1 000 rcf zentrifugiert und das Eluat jeweils in einem neuen, lösungsmittelbeständigen Eppendorfggefäß aufgefangen. Bei welchem Eluent die gebundenen, unterschiedlich stark positiv geladenen Peptide in Lösung gehen, hängt dabei wie bei der HPLC von der Höhe ihrer Ladung ab.

Im Anschluss fand für den Probendurchfluss und die sechs Eluate eine Entfernung des in den Ammoniumacetatlösungen enthaltenen Acetonitrils durch Verdampfen der Flüssigkeit im Vakuumkonzentrator bei 45 °C und anschließender Resuspension der Peptide in 100 µl destilliertem Wasser statt.

2.7.4 Entsalzung mittels StageTips

Als letzter Schritt vor der Vermessung der Probenfraktionen im Massenspektrometer ist aufgrund der im Zuge der Fraktionierung in die Proben eingetragenen Salze eine erneute Entsalzung notwendig. Die einzelnen Fraktionen wiesen jedoch einen vergleichsweise geringen Peptidgehalt auf, weshalb eine Verwendung der Sep-Pak-Säulchen wie in Kapitel III.2.7.1 beschrieben relativ gesehen zu hohen Verlusten geführt hätte. Nach dem dort erläuterten Prinzip funktionieren allerdings auch die selbstgepackten Säulchen die hier zum Einsatz kamen. Hierbei diente kommerziell, in Scheibenform erhältliches Octadecylsilan der Herstellung von StageTips (siehe Kapitel III.2.7.3). Zwei Minischeiben pro Säulchen führten zu einer Bindekapazität von etwa 10 µg Protein.

Die einzelnen Fraktionen der Proben wurden durch Zugabe von 0,3 % Trifluoressigsäure angesäuert. Wie im vorherigen Abschnitt (III.2.7.3) diente der Luftdruck beim Zentrifugieren dem Durchdrücken der Flüssigkeiten durch die Säule. Nach jedem der nachfolgenden Agentien fand daher eine Zentrifugation für eine Minute bei 8 500 rpm statt. Zunächst wurde jede Säule mit 50 µl 80%igem Acetonitril gewaschen und mit 100 µl 0,1%iger Trifluoressigsäure equilibriert. Es folgte das Laden der Proben, die beim Zentrifugieren in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen und ein zweites Mal auf die entsprechende Säule pipettiert wurden. Die mit Pepti-

den beladenen Säulen wurden zwei Mal mit je 100 µl 0,1%iger Trifluoressigsäure gewaschen, bevor die Elution der Peptide mittels 60 µl 80%igem Acetonitril erfolgte. Beim Zentrifugieren dienten lösungsmittelbeständige Eppendorfgläser dem Auffangen der Eluate.

Abschließend wurde eine erneute Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuretest wie in Kapitel III.2.3.1 beschrieben durchgeführt. Um dabei eine Verfälschung des Testergebnisses durch das in den Proben enthaltene Acetonitril zu vermeiden, wurden die von jeder der entsalzten Probenfraktionen entnommenen Duplikate und für die Vergleichbarkeit auch die verwendeten Standards im Vakuumkonzentrator bei 45 °C vollständig eingedampft. Die Resuspension erfolgte direkt im Bicinchoninsäuretest Reagenz.

Vereinzelt fand eine Vereinigung von Fraktionen sehr geringer Peptidkonzentration mit ihrer Nachbarfraktion statt. Lag das enthaltene Gesamtprotein über 3 µg, so wurde nur ein Teilvervolumen, welches 3 µg enthielt, verwendet. Nach Überführung in spezielle low-bind Eppendorfgläser folgte für alle Probenfraktionen das Verdampfen der gesamten Flüssigkeit im Vakuumkonzentrator bei 45 °C. Die Lagerung der Proben bis zur Vermessung im Massenspektrometer erfolgte bei -80 °C.

3 Vermessung der Proben im Massenspektrometer

Die Vermessung der Proben im Massenspektrometer erfolgte durch die AG Biniossek des Instituts für Molekulare Medizin und Zellforschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Dort fand eine weitere Auftrennung der resuspendierten Probenfraktionen durch ein vorgeschaltetes, an das Massenspektrometer gekoppeltes Ultimate3000 micro pump HPLC System statt. Die darin verwendete, mit Octadecan-Material (Reprosil-Pur 120 ODS-3) selbst bepäckte Säule hatte eine Länge von 11 cm und einen Innendurchmesser von 75 µm. Mit einer Flussrate von 300 nl/min diente zunächst 0,5%ige Essigsäure als Eluent, wobei durch einen graduellen Anstieg des Anteils an 0,5%iger Essigsäure in 80%ig Acetonitril und somit an organischem Lösungsmittel die Peptide in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie gelöst wurden. Die eluierten Peptide wurden direkt im angeschlossenen Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL hybrides von Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland analysiert.

4 Analyse der massenspektrometrischen Daten

4.1 Auswertung der Massenspektren mit MaxQuant

Die Identifizierung und Quantifizierung der vermessenen Peptide anhand der Massenspektren sowie auch die darauf basierende Identifizierung und Quantifizierung der in den Proben ursprünglich vorhandenen Proteine erfolgte durch die speziell hierfür vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried entwickelte Software MaxQuant in der Version 1.5.2.8. (COX & MANN, 2008) Hierzu wurden zunächst die Rohdateien aller Fraktionen einer Probe gemeinsam hoch geladen. Bei den allgemeinen, gruppenspezifischen Parametern wurde entsprechend dem in Kapitel III.2.6 beschriebenen Dimethyl-Label ein Dreifachlabel durch Dimethylierung der N-Termini und Lysinreste mit einer Massenadduktion für das leichte, medium und schwere Label von 0, 4 und 8 vorgegeben. Während die Trypsinierung als Standardeinstellung bereits voreingestellt war, erfolgte eine Reduktion der Anzahl an maximal erlaubten verpassten Spaltungen von 2 auf 0. Für alle anderen gruppenspezifischen Parameter wurden die Standardeinstellungen beibehalten.

Das von UniProt (MAGRANE & CONSORTIUM, 2011) im November 2013 zur Verfügung gestellte und ohne Isoformen 20 272 anerkannte Proteinsequenzen mit geprüfter Referenz umfassende, humane Proteom diente als Datenbank für die Identifizierung der Peptide und Proteine. Zur Berechnung der Rate an falsch identifizierten Proteinen (FDR) fand entsprechend der Voreinstellungen in MaxQuant eine Ergänzung dieser Daten durch die umgekehrten Proteinsequenzen statt. Eine FDR von 0,01 wurde aus den Standardeinstellungen beibehalten. Auch die übrigen, voreingestellten allgemeinen Parameter wurden bis auf die Aktivierung der Requantifizierung, der Anpassung der Retentionszeiten zwischen den Läufen und der Berechnung der intensitätsbasierten, absoluten Quantifizierung (iBAQ-Werte) übernommen.

Die nachfolgende Bearbeitung der aus der MaxQuant-Analyse resultierenden Textdateien fand zunächst mit der hierfür ebenfalls vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried entwickelten Software Perseus in der Version 1.5.0.0 statt. Für jede Probe wurden aus den identifizierten Proteingruppen sowohl die zur Bestimmung der FDR inkludierten umgekehrten Proteinsequenzen als auch enthaltene Kontaminanten und Proteingruppen, die ausschließlich anhand eines posttranslational modifizierten Bereichs identifiziert wurden, heraus gefiltert.

Im Anschluss erfolgte die relative Quantifizierung anhand des von MaxQuant für jede Proteingruppe determinierten, normalisierten Verhältnisses zwischen den unterschiedlich gelabelten Anteilen jeder Probe. Hierzu wurde aus diesen berechnet, um welches Vielfache die Proteingruppe im Vergleich zwischen den unterschiedlich markierten, ursprünglichen Gruppen bzw. zum Standard vermehrt oder vermindert vorlag. Diese Ermittlung der so genannten Fold change-Werte (Fc-Werte) fand in Microsoft Excel 2010 durch logarithmieren des normalisierten Verhältnisses zur Basis 2 statt.

4.2 Validierung des Standards

Eine relative Quantifizierung geht mit der Problematik einer mangelnden direkten Vergleichbarkeit von Patientenproben einher, die nicht nach unterschiedlicher Markierung zu einer Probe vereinigt und gemeinsam vermessen wurden. Zur Lösung dieses Problems wurde, wie in Kapitel III.2.5 beschrieben, ein Standard eingesetzt. Für die mit MaxQuant ermittelten, normalisierten Verhältnisse zwischen den gemeinsam analysierten Anteilen einer Probe sollte dabei gelten:

$$\text{Verhältnis} \frac{\text{Gruppe A}}{\text{Gruppe B}} = \frac{\text{Verhältnis} \frac{\text{Gruppe A}}{\text{Standard}}}{\text{Verhältnis} \frac{\text{Gruppe B}}{\text{Standard}}} \quad (1)$$

Nach der Rechenregel für den Logarithmus

$$\log_a \left(\frac{u}{v} \right) = \log_a u - \log_a v \quad (2)$$

ergibt sich daraus für die logarithmischen Fc-Werte (Definition siehe Kapitel III.4.1):

$$\text{Fc-Wert A zu B} = \text{Fc-Wert A zu Standard} - \text{Fc-Wert B zu Standard} \quad (3)$$

Zur Validierung des Standards wurde mittels Pearson-Korrelation für alle Proteingruppen einer jeden Probe geprüft, wie groß der lineare Zusammenhang zwischen den auf diese Weise

aus den Fc-Werten zum Standard errechneten Fc-Werten für die verglichenen Patientenproben und den für diese in der Probe tatsächlich ermittelten Fc-Werten war. Hierzu wurde das Programm IBM SPSS Statistics 23 genutzt. Die Beurteilung der Korrelationskoeffizienten erfolgte nach den Kriterien in Tabelle III-8 (siehe Seite 52).

4.3 Verwendete statistische Testverfahren

Bei der Prüfung von über tausend oder gar mehreren tausend verschiedenen Proteinen auf signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen ergibt sich eine besondere Herausforderung aus dem gleichzeitigen Testen einer Vielzahl an Hypothesen. Für jede einzelne Hypothese kann eine Wahrscheinlichkeit angegeben werden, mit der sie abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist, also kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht, obwohl die Teststatistik einen solchen annehmen lässt. Liegt der Wert für diesen Fehler erster Art unter 0,05, so wird im Allgemeinen von einem signifikanten Ergebnis gesprochen. Für die wiederholte Durchführung eines solchen Hypothesentests bedeutet dies allerdings, dass man allein aufgrund des Fehlers erster Art in bis zu fünf Prozent der Fälle einen signifikanten Unterschied erhält, auch wenn kein Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht. Bei tausend Proteinen wären dies 50 falsch positive Treffer.

Das Bewusstsein um diese Problematik ist nicht neu. So berichtet SHAFFER (1995) in seinem Review zum Multiple hypothesis testing von Cournot, der bereits 1843 Überlegungen zu diesem Thema angestellt hat. Insbesondere durch die umfangreiche Daten produzierenden, modernen molekularbiologischen Methoden in Genomik und Proteomik besteht auch aktuell ein Interesse an statistischen Modellen, die versuchen diesem Sachverhalt gerecht zu werden. So wurden die beiden in dieser Arbeit verwendeten statistischen Testverfahren, linear models for microarray data (SMYTH, 2004) (Limma) und significance analysis of microarrays (TUSHER et al., 2001) (SAM) ursprünglich zur Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Genen bei der Auswertung von Microarrays entwickelt.

Zur Durchführung des Limmas wurde ein speziell für proteomische Daten von Alejandro Gomez-Auli der AG Reinheckel des Instituts für Molekulare Medizin und Zellforschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg geschriebenes Skript zur Anwendung des Limma-Pakets (RITCHIE et al., 2015) in der unter <https://www.r-project.org/> frei erhältlichen Software R verwendet. Der ebenfalls frei erhältliche MultiExperiment Viewer (SAEED et al., 2003) in der Version 4_9_0_r2731 diente der Bestimmung von im SAM signifikant veränderten Proteinen. Dem Versuchsaufbau entsprechend wurde der SAM für zwei unabhängige Gruppen ausgeführt. Die Anzahl an Permutationen entsprach der Anzahl eindeutiger Permutationen. Die Festlegung des testspezifischen S_0 -Werts erfolgte automatisch nach der von TUSHER und Mitarbeiter (2001) definierten Methode.

4.4 Identifizierung angereicherter, biologischer Motive

Im Anschluss an die Ermittlung der individuellen, signifikant veränderten Proteine, wurde die so erhaltene Liste auch im Hinblick auf eine Anreicherung von biologischen Motiven analysiert. Derartige biologische Motive können z. B. eine zelluläre Lokalisation, ein biologischer Prozess oder eine molekulare Reaktionsweise sein. Hierzu werden die für die einzelnen Proteine in Datenbanken hinterlegten Annotationen auf Gemeinsamkeiten untersucht. Die in der Version 6.7 verwendete, im Internet frei zugängliche Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) bietet hierbei die Option, neben dem gesamten humanem Proteom

einen dem Experiment entsprechenden Hintergrund zu definieren. Bei der Analyse wird sowohl für den Hintergrund als auch für die Liste an veränderten Proteinen für jedes biologische Motiv bestimmt, wie hoch der Anteil der Proteine ist, die diesem Merkmal zugeordnet werden können. Ist dieser für die analysierte Liste größer als im Hintergrund, so wird von einer Anreicherung dieses Motivs ausgegangen. Anhand eines modifizierten Fisher-Yates-Tests berechnet DAVID automatisch die Signifikanz dieses Unterschieds. Bei dem DAVID-Modul Functional Annotation Clustering werden ähnliche Annotationen zu Gruppen zusammen genommen. Für jede Gruppe wird das geometrische Mittel aus den Signifikanzniveaus der einzelnen Annotationen dieser Gruppe bestimmt. Der so ermittelte Score spiegelt somit wider, welche Bedeutung der jeweiligen Gruppe in der Analyse zu zurechnen ist. (HUANG et al., 2009)

Diese funktionelle Analyse mit DAVID beinhaltet die Annotationen der Datenbanken, die standardmäßig in DAVID vorausgewählt sind. Diese umfassen unter anderem die Annotationen des Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) und die Signalwege der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Kanehisa Laboratories, Japan.

5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Gewebeschnitten

Während die Auswahl eines geeigneten Gewebeblocks für jeden Fall anhand der archivierten im Rahmen der routinemäßigen Diagnostik angefertigten HE-gefärbten Schnitte erfolgte, wurden die Tumoreale für die mikroskopisch kontrollierte Makrodissektion nach Kapitel III.2.1 an neuen Gewebeschnitten ausgewählt. Diese wurden unmittelbar vor den für die Probenaufbereitung verwendeten Schnitten von dem jeweiligen, vorgekühlten Block geschnitten, um eine Beeinflussung der mikroskopisch kontrollierten Makrodissektion durch räumliche Veränderungen der Gewebearrangement im Block zu vermeiden. Die am verwendeten Mikrotom eingestellte Schnittdicke betrug 2 µm. Die Schnitte wurden direkt vom Mikrotom in ein Streckbad verbracht und auf Objektträger aufgezogen. Eine Auflistung der zur Anfertigung der Schnitte verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellerangaben ist in Anhang IX.1.2 zu finden.

Alle darauf folgenden Schritte, von der Trocknung über die Entparaffinierung und Rehydrierung sowie die eigentliche Färbung mit Hämatoxylin und Eosin bis zur erneuten Dehydrierung und dem Eindecken der Schnitte, erfolgten automatisiert durch den routinemäßig in der Diagnostik eingesetzten Coverstainer der Firma Dako. Das genaue Protokoll sowie die speziell für den Coverstainer von Dako bereitgestellten, verwendeten Reagenzien sind dem Anhang (IX.1.2 und IX.6) zu entnehmen.

6 Immunhistochemische Reaktionen an Gewebeschnitten

Die für die immunhistochemischen Reaktionen verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte sind mit Herstellerangaben im Anhang IX.1.2 aufgelistet. Die Dicke der zu färbenden Gewebeschnitte betrug 2 µm. Deren Anfertigung erfolgte wie bei den Gewebeschnitten für die HE-Färbung (siehe Kapitel III.5), allerdings wurden beschichtete Objektträger verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation von 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank.

6.1 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte automatisiert in einem hierfür routinemäßig verwendeten, kontinuierlichen Linearfärbeautomaten. Die ersten 15

der in diesem enthaltenen Küvetten waren zur Entparaffinierung mit Xylol befüllt. Darauf folgten vier Küvetten mit 99 %, eine mit 96 % und eine mit 70 % Ethanol. Nach dieser Ethanolreihe wurden die Schnitte in den letzten beiden Küvetten mit destilliertem Wasser gespült. Dabei betrug die Verweilzeit in jeder der 23 Küvetten 1,5 Minuten. Das auf diese Weise rehydrierte Gewebe wurde ab diesem Zeitpunkt bis zum Abschluss der Färbungen permanent feucht gehalten.

6.2 Vorbehandlungen zur Antigendemaskierung

Das zur Fixierung der Proben verwendete Formaldehyd bewirkt unter anderem Quervernetzungen zwischen Proteinen durch die Bildung von Methylenbrücken. (FRAENKEL-CONRAT & OLCOTT, 1948) Dies führt neben der gewünschten Konservierung des Gewebes allerdings auch zu Veränderungen der Proteinstrukturen, wodurch die von den in der IHC verwendeten Antikörpern erkannten Epitope maskiert werden können. Da dieser Prozess je nach Epitop reversibel ist (SHI et al., 1991; WERNER et al., 1996), kamen zur Freilegung der durch die Formalinfixierung möglicherweise maskierten Epitope verschiedene Vorbehandlungen zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung zum Einsatz. Neben einem im Haus angesetzten Citratpuffer (siehe Anhang IX.2) wurden hierzu verschiedene kommerzielle Antigendemaskierungslösungen wie im Folgenden beschrieben verwendet. Die Vorbehandlung erfolgte mit Ausnahme bei der Verwendung des PT Link-Moduls nach der Entparaffinierung der Schnitte.

Der genaue Ansatz des auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellten Citratpuffers ist dem Anhang IX.2 zu entnehmen. Dieser wurde in einem Dampfkochtopf zunächst unter losem Aufsetzen des Deckels zum Kochen gebracht. Danach wurden die entparaffinierten Schnitte in einem Objektträgerständer in den kochenden Puffer gestellt und der Deckel vollständig verschlossen. Ab Erreichen des maximalen Drucks betrug die Verweilzeit zwei, fünf oder zehn Minuten. Das Abkühlen des Dampfkochtopfs erfolgte unter fließendem Wasser.

Bei den kommerziellen Antigendemaskierungslösungen handelte es sich um einen Tromethamin-Ethylendiamintetraacetat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 und einen modifizierten Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,1. Die zehnfach konzentrierten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser auf eine einfach konzentrierte Gebrauchslösung verdünnt und in abgedeckten Küvetten in einen Dampfgarer verbracht. Im Anschluss an eine Vorheizphase inkubierten die entparaffinierten Schnitte in diesem für 30 Minuten bei pH 6,1 oder für 20 Minuten bei pH 9,0. Zur Abkühlung wurden die Schnitte samt der Küvetten in Eiswasser gestellt.

Die zur Diagnoseabsicherung eingesetzten Färbungen erfolgten nach den für diese im Routinelabor der Diagnostik etablierten Protokollen. Demnach wurde die Vorbehandlung für diese Färbungen zusammen mit der Entparaffinierung und Rehydrierung in dem hierfür entwickelten PT Link-Modul von Dako durchgeführt. Auch hier kamen ein Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,1 und ein Tromethamin-Ethylendiamintetraacetat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 zum Einsatz. Diese speziell für das PT Link-Modul vertriebenen, fünfzigfach konzentrierten Antigendemaskierungslösungen wurden als einfache Gebrauchslösungen im PT Link-Modul auf 75 °C vorgeheizt. Nach dem Einsetzen der Schnitte fand das Aufheizen auf die eingestellte Temperatur und das Abkühlen nach einer ebenfalls einstellbaren Zeitdauer automatisch statt. Die Einstellungen erfolgten abhängig vom pH-Wert, wodurch die Schnitte für 15 Minuten in der Lösung mit dem höheren oder 20 Minuten in der mit dem niedrigeren pH-Wert jeweils bei 95 °C inkubierten.

Für alle Vorbehandlungen folgte nach dem Abkühlen der Schnitte zunächst ein Spülschritt mit destilliertem Wasser bevor diese in eine Küvette mit Waschpuffer verbracht wurden.

6.3 Antikörperetablierung

Abgesehen von den zur Diagnoseabsicherung eingesetzten Färbungen, wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper zunächst ein Färbeprotokoll etabliert, bevor diese an den Proben des Patientenkollektivs angewendet wurden.

Um ein für das Zielgewebe optimiertes Protokoll zu erhalten, diente nicht neoplastisches Nierengewebe der Etablierung. Zusätzlich wurde das im Datenblatt des Herstellers als Positivkontrolle empfohlene Gewebe in die Austestung des Antikörpers mit einbezogen. Es handelte sich um Tonsillen-, Pankreas- und Endometriumgewebe. Eine genaue Zuordnung der verwendeten Gewebe zu den eingesetzten Antikörpern ist Tabelle III-5 zu entnehmen.

Für jeden Antikörper fand ein Vergleich des Färbeergebnisses nach Vorbehandlung (siehe Kapitel III.6.2) mit dem Citratpuffer im Schnellkochtopf bei verschiedenen Verweilzeiten, mit den beiden kommerziellen Antigendemaskierungslösungen im Dampfgarer und ohne Vorbehandlung statt. Des Weiteren wurde jeweils die Verdünnung des Primärantikörpers und teilweise auch dessen Inkubationszeit auf den Gewebeschnitten variiert. Bei starker Hintergrundfärbung erfolgte der Versuch durch Einsatz eines Proteinblocks oder durch Weglassen des Linkers (siehe für beide Kapitel III.6.4) das Färbeergebnis zu verbessern.

Das Kriterium für das beste Färbeergebnis bestand in einer spezifischen Reaktion des für das ausgewählte Protein zu erwartenden Zellkompartiments der Zielzelle bei möglichst geringer, unspezifischer Hintergrundfärbung. Zusätzlich wurden zur Beurteilung die immunhistochemischen Färbungen im Human Protein Atlas (UHLÉN et al., 2015) konsultiert.

Tabelle III-5. Im Rahmen der Arbeit etablierte Primärantikörper

Zielprotein	Klon (nur bei monoklonalen)	Klonalität	Herkunftsspezies	Hersteller	Lieferkonzentration [mg/ml]	Etablierungsge-webe	Vorbehandlung	Verdünnung ⁴	Inkubationszeit [Minuten]
Aminopeptidase N (CD13)	EPR4058	monoklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	0,68	Niere	keine	1 : 5 000	60
unspezifische cytosolische Dipeptidase (CNDP2)	6D3	monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, England	keine Herstellerangabe vorhanden	Pankreas, Endometrium	Dampfger, pH 6,1	1 : 150 mit Proteinblock	60
Integrin alpha-V (ITGAV)	EPR16800	monoklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	0,949	Niere	Dampfger, pH 9	1 : 7 000	60
Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP1)	---	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	1	Niere	Dampfger, pH 9	1 : 300	60
Retinol-Dehydrogenase 11 (RDH11)	---	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	1	Niere	Dampfger, pH 9	1 : 800	60
Sorbitol-Dehydrogenase (SORD)	4D3	monoklonal	Maus	Abnova, Taipei City, Taiwan	0,44	Niere	Dampfger, pH 9	1 : 6 000	60
Valosin-enthaltendes Protein (VCP)	5	monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, England	keine Herstellerangabe vorhanden	Tonsille	Dampfger, pH 6,1	1 : 10 000	60

⁴ als Verhältnis des Antikörpervolumens zum Gesamtvolumen

Tabelle III-6. Verwendete, für die routinemäßige Diagnostik bereits etablierte Primärantikörper

<i>Zielpotein</i>	<i>Klon (nur bei mono-klonale)</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Herkunfts- spezies</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Positiv- kontrolle</i>	<i>Vorbe- handlung</i>	<i>Verdün- nung⁵</i>	<i>Inkubati- onszeit [Minuten]</i>	<i>mit Linker</i>
Mast-/Stammzel- len-Wachstums- faktor Rezeptor Kit, CD117 (c-kit)	---	polyklonal	Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutsch- land	interne Kontrolle	PT Link- Modul, niedriger pH-Wert	1 : 100	20	ja
Cytokeratin 7 (ck7)	OV-TL 12/30	mono- klonal	Maus	Dako, Hamburg, Deutsch- land	Tonsille	PT Link- Modul, niedriger pH-Wert	ge- brauchs- fertige Lö- sung	15	ja
Epithelial cell ad- hesion molecule (ep4)	Ber-EP4	mono- klonal	Maus	Dako, Hamburg, Deutsch- land	Niere	PT Link- Modul, niedriger pH-Wert	ge- brauchs- fertige Lö- sung	20	ja
Renal cell carci- noma marker – gp200 (RCC)	SPM314	mono- klonal	Maus	Dako, Hamburg, Deutsch- land	Niere	PT Link- Modul, niedriger pH-Wert	ge- brauchs- fertige Lö- sung	20	ja
Vimentin (VIM)	Vim 3B4	mono- klonal	Maus	Dako, Hamburg, Deutsch- land	interne Kontrolle	PT Link- Modul, hoher pH-Wert	ge- brauchs- fertige Lö- sung	20	nein

⁵ als Verhältnis des Antikörpervolumens zum Gesamtvolumen

6.4 Färbeprotokoll

Nach der Vorbehandlung erfolgten die eigentlichen immunhistochemischen Färbungen sowohl für die Antikörperetablierung als auch der Patientenkollektive mit Hilfe eines Autostainers.

Bei einer immunhistochemischen Reaktion bindet zunächst ein Primärantikörper mit seinem Paratop spezifisch an das in dem zu detektierenden Protein enthaltene Epitop. Abbildung III-7 zeigt das Wirkprinzip des nach dem Primärantikörper verwendeten Detektionssystems EnVision Flex+ System. Dabei handelt es sich um Polymere, bei denen jeweils an einem Dextranrückgrat bis zu 20 Sekundärantikörper und bis zu 100 Peroxidasemoleküle gekoppelt sind. Dies führt zu einer Signalverstärkung und somit zu einer hohen Sensitivität des Systems. (SABATTINI et al., 1998) Bei dem verwendeten Polymerkonjugat stammen die gebundenen Sekundärantikörper aus der Ziege, wobei sowohl Polymere mit gegen Maus- als auch gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichteten Antikörpern in dem Reagenz vorhanden sind. Aus diesem Grund binden die Polymerkonjugate des gleichen Reagenz an aus Kaninchen und Mäusen stammende Primärantikörper. Die somit über Polymer, Sekundär- und Primärantikörper an das Zielprotein gebundene Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des im nächsten Schritt zugegebenen Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid zu einem unlöslichen, dunkelbraunen Produkt bei gleichzeitiger Reduktion des ebenfalls zugegebenen Wasserstoffperoxids.

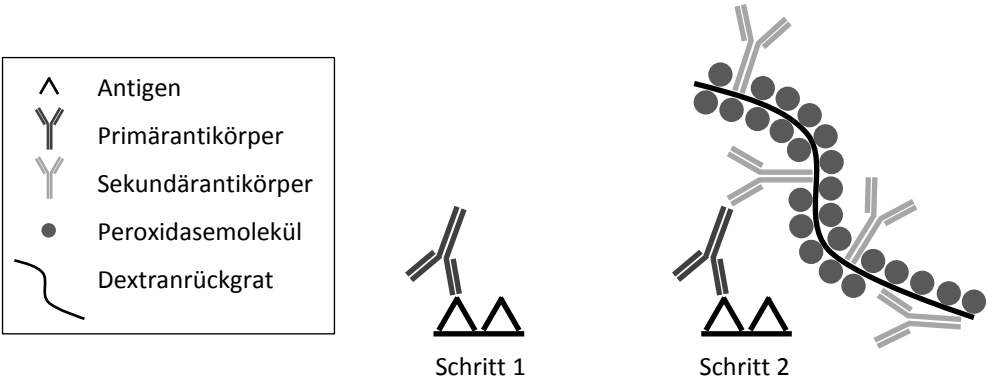


Abbildung III-7. Das in zwei Schritten ablaufende, auf einem Polymer basierende immunhistochemische Detektionssystem EnVision Flex+. Ein aus Maus oder Kaninchen stammender, gegen ein beliebiges Epitop gerichteter Primärantikörper erkennt im ersten Schritt das Antigen im Gewebe. Im zweiten Schritt binden die an ein Polymer aus Meerrettichperoxidasemolekülen und Dextranrückgrat gekoppelten Sekundärantikörper an die Primärantikörper. Modifiziert nach TAYLOR und RUDBECK (2013).

Tabelle III-7. Übersicht der durch den Autostainer pipettierten Schritte bei immunhistochemischen Reaktionen

Schritt	Reagenz	Inkubationszeit [Minuten]
1. Enzymblockierung	Peroxidase-Blocking Reagent	5
2. Primärantikörper	siehe Tabelle III-5 und Tabelle III-6	
3. Linker	Mouse/Rabbit LINKER	15
4. Sekundärantikörper	EnVision FLEX/HRP	20
5. Substrat/Chromogen	H ₂ O ₂ (Substrat) und DAB+	10

Die einzelnen hierzu durch den Autostainer pipettierten Schritte und die jeweiligen Inkubationszeiten der Reagenzien auf den Gewebeschnitten sind Tabelle III-7 zu entnehmen. Nach jedem Schritt erfolgte ein Waschschrift mit Waschpuffer bzw. am Ende des Protokolls mit destilliertem Wasser. Das im ersten Schritt eingesetzte Peroxidase-Blocking Reagent enthielt Wasser-

stoffperoxid und Natriumazid, um eine unspezifische Reaktion durch endogene Peroxidaseaktivität zu verhindern. Die Primärantikörper wurden gemäß dem in Tabelle III-5 bzw. Tabelle III-6 angegebenen Verhältnis mit einem Verdünnungspuffer (siehe Anhang IX.1.2) verdünnt. Im Falle des Antikörpers für CNDP2 ergab die Antikörperetablierung (siehe Kapitel III.6.3), dass das Ersetzen des Verdünnungspuffers zur Hälfte mit einem Proteinblock das Färbeergebnis deutlich verbesserte. Dieses Kasein enthaltende, serumfreie Reagenz reduziert eine auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und Gewebeproteinen zurückzuführende unspezifische Hintergrundfärbung. (BOENISCH, 2006) Vor der Zugabe der polymerebenen Sekundärantikörper diente, außer bei der Färbung von VIM, der Einsatz eines der Herkunftsspezies des Primärantikörpers entsprechenden Linkers der Signalverstärkung. Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe des 3,3'-Diaminobenzidins. Dieses wurde für jede Färbung frisch durch Verdünnen von 2 µl 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid enthaltender Chromogenlösung je 100 µl Wasserstoffperoxid beinhaltenen Substrat-Puffer angesetzt.

Jeder Lauf des Autostainers zur Färbung von Patientenproben inkludierte zwei Schnitte des zur Antikörperetablierung verwendeten Nierengewebes. Während hierbei der eine äquivalent zu den Patientenproben behandelt wurde, fungierte der zweite durch Ersetzen des Primärantikörperschritts durch Inkubation mit dem reinen Verdünnungspuffer als Negativkontrolle.

Zum Schluss folgte für alle Schnitte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun. Hierzu wurden diese für eine Minute in Hämalaun und anschließend zum Bläuen in eine Küvette unter warmem, fließendem Wasser gestellt. Vor dem Eindecken der Schnitte mit Xylol durch einen Eindeckautomaten fand eine Dehydrierung dieser durch viermaliges Schwenken in 99 % Ethanol gefolgt von zweimal in 100 % Xylol statt.

7 Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen

7.1 Qualitative Beurteilung

Das in Kapitel III.2.1 beschriebene Verfahren der mikroskopisch kontrollierten Makrodissektion zur Probengewinnung aus FFPE-Gewebe führt dazu, dass in der Massenspektrometrie nicht das reine Proteom der Tumorzellen, sondern das des Tumorgewebes analysiert wird. Aus diesem Grund können detektierte Unterschiede prinzipiell auch auf eine zwischen den Vergleichsproben variierende Proteinexpression der Zellen des Tumorstromas, wie Fibrozyten und Endothelzellen oder auch von Entzündungszellen zurückzuführen sein. Die IHC wurde daher zunächst rein qualitativ zur Bestimmung der zur Expression der untersuchten Proteine beitragenden Zellarten genutzt.

7.2 Semiquantitative Evaluation

Im Anschluss an die qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktionen erfolgte eine semiquantitative Evaluation. Dabei wurde die Proteinexpression der Tumorzellen als größte Zellpopulation in den analysierten Proben bewertet. Unter der Annahme, dass größere Zellen auch mehr Gesamtprotein enthalten, fand in Anlehnung an die von der Zellzahl unabhängige, massenspektrometrische Analyse eine Quantifizierung der durch die Tumorzellen eingenommenen Fläche und nicht der Tumorzellzahl statt. Zelleere Bereiche wie z. B. zystische Strukturen zählten hierbei nicht zur evaluierten Gesamtfläche. Bei membranären Färbungen bestimmte die Färbung der Membran welcher Intensität die von der Zelle eingenommene Fläche zugerechnet wurde. Die Quantifizierung erfolgte semiquantitativ, wobei eine Einteilung in 0 für

negativ, 1 für schwach, 2 für mäßig und 3 für stark gefärbt angewendet wurde. Abbildung III-8 zeigt ein Beispiel für jede dieser vier Intensitäten. Die Bewertung bestand in einer Abschätzung des von den mit der jeweiligen Intensität gefärbten Bereichen eingenommenen, prozentualen Anteils an der Gesamtfläche.

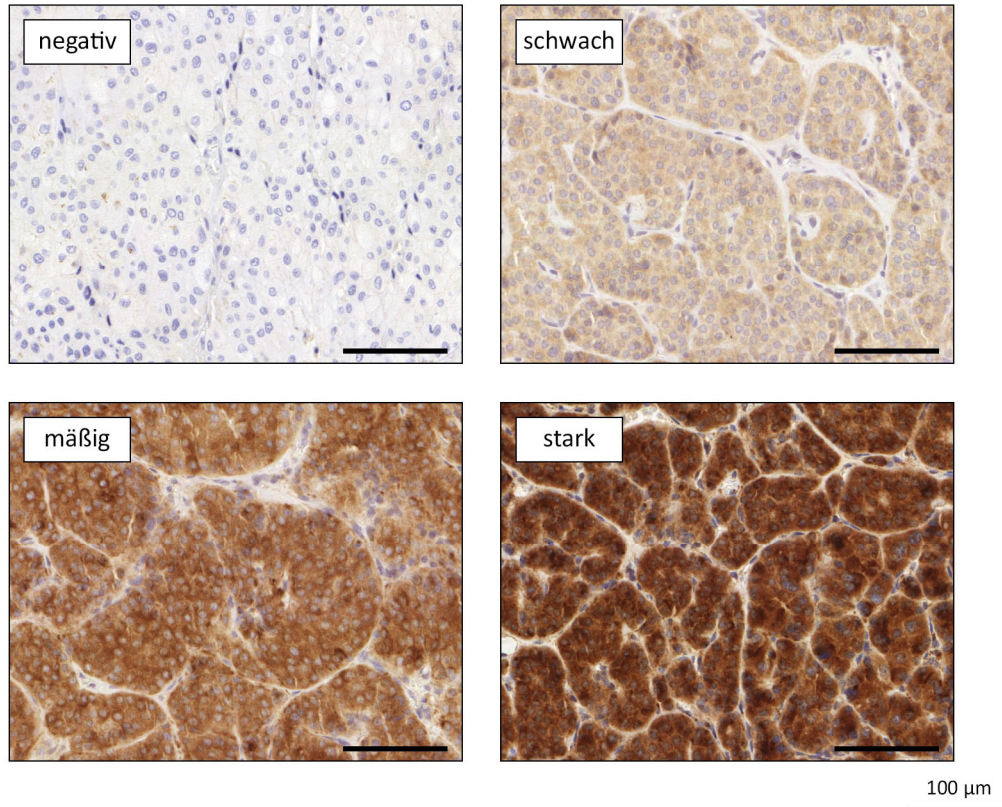


Abbildung III-8. Die vier bei der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen angewendeten Färbeintensitäten. Für negativ, schwach, mäßig und stark gefärbt ist je ein Beispiel gezeigt. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

7.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Neben der semiquantitativen Evaluation erfolgte zusätzlich eine computergestützte Auswertung. Hierzu wurden die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte mit einem Schnittescanner digitalisiert und anschließend die Tumorareale manuell in dem Programm Panoramic Viewer von 3D HISTECH Ltd., Budapest, Ungarn eingezeichnet und exportiert. Die Analyse erfolgte mit dem für immunhistochemische Reaktionen von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen entwickelten Zusatzmodul IHC Profiler des frei verfügbaren Bildanalyseprogramms ImageJ (ABRÀMOFF et al., 2004). Hierbei wendet IHC Profiler zunächst einen optimierten Vektor des Zusatzmoduls color deconvolution (RUIFROK & JOHNSTON, 2001) an, um die durch die Gegenfärbung mit Hämalaun verursachte Färbung von der DAB-bedingten zu trennen. Auf diese Weise wird ein neues Bild generiert, das isoliert nur die IHC abhängige Färbung zeigt. Im nächsten Schritt wird dieses Pixel für Pixel analysiert und für jeden Bildpunkt die Intensität bestimmt. Jeder Pixel kann hierbei einen Wert von 0 im dunkelsten bis 255 im hellsten Fall annehmen. Als Ergebnis liefert IHC Profiler ein Histogramm, das die Anzahl der Pixel für jede Intensität ausgibt. In Anlehnung an eine manuelle Auswertung durch einen Pathologen findet zusätzlich eine automatische Einteilung in vier Grade statt, wobei für jeden Grad der prozentuale Anteil an der

Pixelgesamtzahl angegeben wird. Durch einen Algorithmus wird daraus eine Beurteilung von negativ über schwach positiv und positiv bis stark positiv für das Gesamtbild ermittelt. (VARGHESE et al., 2014) Das Funktionsprinzip des IHC Profilers wird in Abbildung III-9 veranschaulicht.

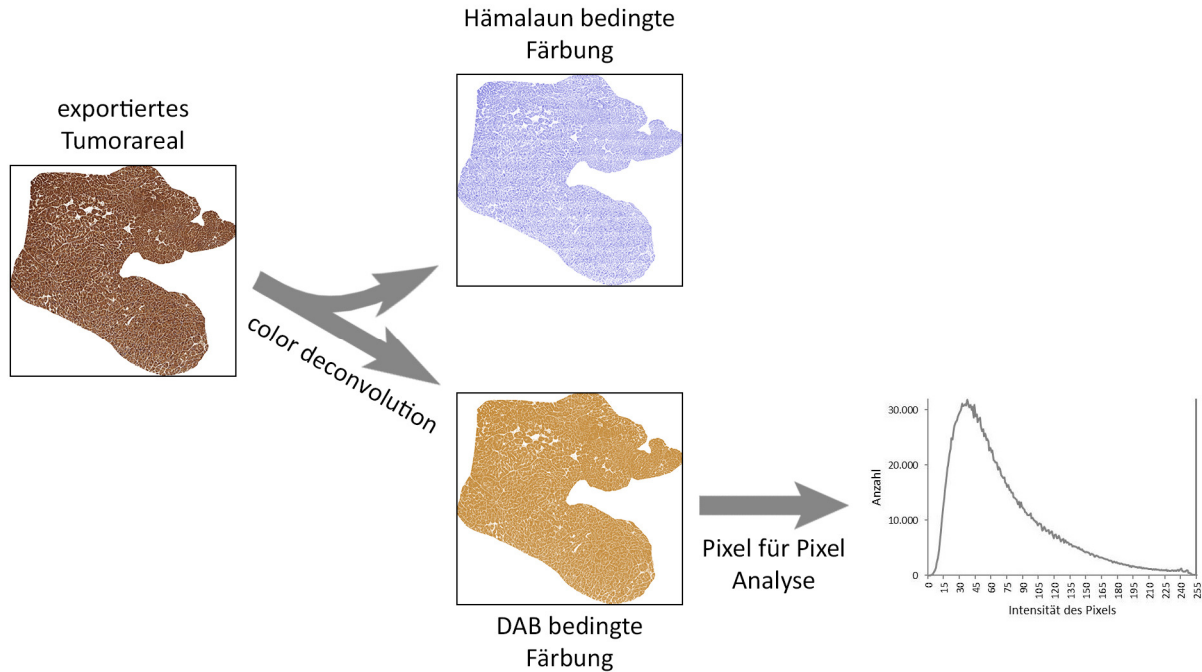


Abbildung III-9. Funktionsprinzip des IHC Profilers in ImageJ. Im ersten Schritt werden die Hämalaun und die DAB bedingten Färbungen durch das Modul color deconvolution getrennt. Das für die DAB-Färbung generierte Bild wird im nächsten Schritt Pixel für Pixel analysiert und für alle möglichen Pixelwerte (0 bis 255) die Anzahl an Pixel mit dem jeweiligen Wert ausgegeben.

Der Export der Tumoreale für die Analyse mit IHC Profiler führt zu einer Weißfärbung aller nicht ausgewählten Bereiche. Somit bewirken diese eine unspezifische Erhöhung der Pixelanzahl mit dem Wert 255. Während diese Intensität bei der Einteilung in die vier Grade nicht berücksichtigt wird (VARGHESE et al., 2014) und daher die Beurteilung durch IHC Profiler dadurch nicht beeinträchtigt ist, beeinflusst die Größe der nicht ausgewählten Areale das Histogramm. Aus diesem Grund wurden die Histogramme unter Ausschluss der Intensität 255 neu erstellt. Außerdem waren nicht alle Bilder gleichgroß, weshalb auch die Pixelgesamtzahl variierte. Daher wurde in diesem Zug die absolute Anzahl der Pixel bei jeder Intensität zur besseren Vergleichbarkeit durch die relative Häufigkeit ersetzt. Diese errechnete sich als Quotient aus der absoluten Anzahl und der um die Anzahl bei 255 bereinigte Pixelgesamtzahl.

Ergänzend erfolgte für jeden Fall die Berechnung einer Bewertungszahl nach Formel (4).

$$\text{Bewertungszahl} = \sum_{i=0}^{254} \left(\text{Intensität}_i * \frac{\text{Anzahl bei Intensität}_i}{\text{Pixelgesamtzahl} - \text{Anzahl bei 255}} \right) \quad (4)$$

7.4 Verwendete statistische Testverfahren

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen sowie auf Korrelationen zwischen den Ergebnissen der verwendeten Methoden wurde das Programm IBM

SPSS Statistics 23 genutzt. Die Auswahl des verwendeten statistischen Tests hing von einer Normalverteilung der Daten ab. Neben der Beurteilung der Histogramme und Q-Q-Diagramme galt als Kriterium für die Annahme einer Normalverteilung, dass das Ergebnis des Shapiro-Wilk-Tests dieser zum Signifikanzniveau von 5 % nicht widersprach. War dies für die Daten beider Vergleichsgruppen erfüllt, fand zur Bestimmung der Signifikanz von Mittelwertsunterschieden der zweiseitige Zweistichproben-t-Test für unabhängige Proben Anwendung. Das Programm SPSS liefert hierbei automatisch sowohl die Wahrscheinlichkeit für Proben mit gleicher als auch mit unterschiedlicher Varianz und das Ergebnis des Levene-Tests der Varianzgleichheit für die Daten. Lag das Ergebnis von letzterem unter 0,05, so wurde von einer unterschiedlichen Varianz ausgegangen. Wenn nicht für beide Gruppen eine Normalverteilung angenommen werden konnte, diente der Mann-Whitney-U-Test als Alternative. In den Abbildungen dieser Arbeit sind hierbei nur signifikante Ergebnisse angegeben.

Ob zwischen den bei der massenspektrometrischen Analyse ermittelten Fc-Werten und den Ergebnissen aus der IHC bzw. zwischen den Ergebnissen der semiquantitativen Evaluation und der Auswertung mit IHC Profiler eine lineare Korrelation besteht, wurde bei normalverteilten Daten mittels Pearson-Korrelationskoeffizient geprüft. War für die Ergebnisse einer oder beider der jeweils verglichenen Methoden keine Normalverteilung nach den oben genannten Kriterien anzunehmen, wurde auf den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho ausgewichen. Die Überprüfung einer linearen Korrelation mit den Ergebnissen aus der semiquantitativen Evaluation gelang anhand einer Bewertungszahl, die äquivalent zu jener für die Auswertung mit IHC Profiler (siehe Kapitel III.7.3) nach Gleichung (5) berechnet wurde.

$$\text{Bewertungszahl} = \sum_{i=0}^3 (\text{Intensität}_i * \text{Flächenanteil mit Intensität}_i) \quad (5)$$

Die Interpretation der Korrelationskoeffizienten erfolgte nach der Einteilung in Tabelle III-8.

Unabhängig vom verwendeten Test galt ein Ergebnis als signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,05 und hoch signifikant, wenn sie kleiner als 0,01 war.

Tabelle III-8. Bei der Interpretation der Korrelationskoeffizienten angewendete Einteilung

<i>Korrelationskoeffizient</i>	<i>Bewertung</i>
0	keine Korrelation
> 0 bis 0,19	sehr schwache Korrelation
0,2 bis 0,39	schwache Korrelation
0,4 bis 0,59	mittlere Korrelation
0,6 bis 0,79	starke Korrelation
0,8 bis 0,99	sehr starke Korrelation
1	perfekte Korrelation

IV ERGEBNISSE

1 Vergleich metastasierender mit nicht metastasierenden ccRCC

1.1 Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse

Die massenspektrometrische Analyse für den Vergleich zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen umfasste die Fraktionen von sechs Proben. Jede dieser Proben setzte sich wie der genauen Zuordnung in Teil B der Abbildung III-4 (siehe Seite 34) zu entnehmen ist aus einer Patientenprobe der Gruppe mit Metastasen, einer der Gruppe ohne Metastasen und dem Standard zusammen.

1.1.1 Identifizierung und Quantifizierung durch MaxQuant

Durch die Analyse der Massenspektren in MaxQuant konnten zwischen 5 117 und 8 587 Peptide je nach Probe identifiziert werden. Auf Proteinebene ergab sich daraus die Identifizierung von insgesamt 3 044 verschiedenen Proteingruppen. Eine Proteingruppe besteht dabei aus einem oder, wenn aufgrund der identifizierten Peptide keine eindeutige Zuordnung möglich ist, aus mehreren Proteinen. Da 88 % der Proteingruppen aus nur einem Protein bestanden, wird im Folgenden nicht zwischen Proteingruppen und Proteinen unterschieden.

Von den identifizierten Proteinen waren für einen Vergleich zwischen den klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit und ohne Metastase diejenigen Proteine von Bedeutung, für die auch eine relative Quantifizierung möglich war. Da eine Quantifizierung nur bei einer ausreichenden Qualität des ermittelten Massenspektrums erfolgt, ist die Anzahl der quantifizierten Proteine geringer als die der identifizierten. Aus Abbildung IV-1 können für die einzelnen Proben die Anzahlen der Proteine entnommen werden, für die das Verhältnis zwischen den beiden enthaltenen Patientenproben quantifiziert wurde. Die Identifizierung und Quantifizierung eines Proteins bei einer massenspektrometrischen Analyse hängt von vielen Faktoren ab, so dass nicht in jeder Probe gleichviel und nicht immer die gleichen Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Insgesamt konnte für 2 168 verschiedene Proteine in mindestens einer Probe das Verhältnis zwischen den beiden Patientenproben quantifiziert werden. Für 35 % dieser Proteine lag das Verhältnis in allen sechs Proben vor. Für die Verhältnisse der zwölf Patientenproben jeweils zum Standard, für einen von der zufälligen Probenpaarung unabhängigen Vergleich, ergaben sich ähnliche Anzahlen, da, wenn die Quantifizierung eines Proteins in einer Probe möglich war, dies dann meist für alle drei unterschiedlich gelabelten Anteile zutraf. Bei insgesamt 102 Proteinen war dem nicht so, wobei in 99 Fällen nur das Verhältnis zwischen dem medium und leicht gelabeltem Probenanteil quantifiziert wurde. Betroffen waren pro Protein zu 92 % nur eine Probe und nie mehr als zwei. Daraus ergeben sich die Abweichungen, die durch die Darstellung in Abbildung IV-1 der für alle Proben zusammen genommenen Anzahlen der ermittelten Verhältnisse zum Standard im Vergleich zu denen zwischen den beiden Patientenproben ersichtlich werden. Insgesamt erfolgte eine Quantifizierung zum Standard für 2 190 verschiedene Proteine. Mit 1 139 Proteinen traf es auf gut die Hälfte von diesen zu, dass bei den beiden zu vergleichenden Gruppen für jeweils mindestens vier der sechs Patientenproben das Verhältnis zum Standard quantifiziert wurde, wobei dies bei 22 Proteinen in einer der beiden Gruppen für eine Patientenprobe mehr möglich war.

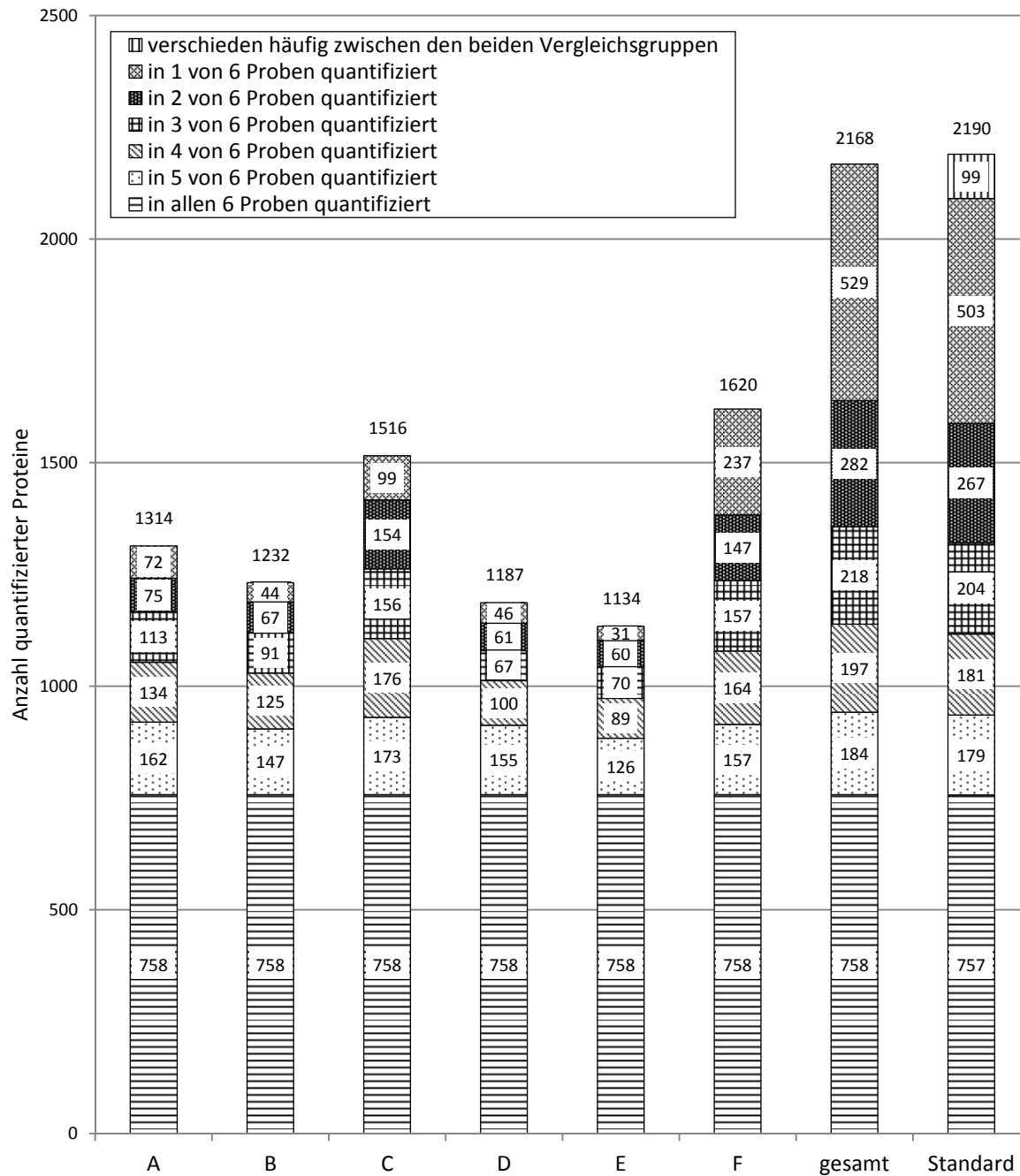


Abbildung IV-1. Anzahl der Proteine für jede Probe (A-F), bei denen das Verhältnis zwischen den enthaltenen Patientenproben der Gruppe mit und ohne Metastase quantifiziert wurde. Unter gesamt ist die Gesamtzahl aller unterschiedlichen Proteine aufgetragen, für welche mindestens ein solches Verhältnis in den Proben A-F ermittelt werden konnte. Die angegebenen Häufigkeiten sind danach unterteilt, in wie vielen der sechs Proben A-F diese Quantifizierung zwischen den Patientenproben für ein jeweiliges Protein möglich war. Analog fasst Standard die Häufigkeit aller Proteine zusammen, für die eine Quantifizierung der Patientenprobe zum Standard durchgeführt werden konnte. Die Unterteilung der Häufigkeit erfolgte in diesem Fall danach, mit wie vielen Patientenproben je Gruppe das Verhältnis zum Standard quantifiziert werden konnte.

1.1.2 Validierung des Standards

Der für die klarzelligen Nierenzellkarzinome verwendete Standard wurde nach Gleichung (3) (siehe Kapitel III.4.2) geprüft. Hierzu fand für jede Proteingruppe einer jeden Probe die Berechnung des Fc-Wertes aus dem Verhältnis zwischen den beiden Patientenproben und der Differenz der Fc-Werte aus dem Verhältnis dieser jeweils zum Standard statt. Diese beiden errech-

neten Werte unterschieden sich im arithmetischen Mittel aller Proteingruppen einer Probe um einen Betrag von 0,01 bis 0,20 mit einer Standardabweichung von 0,23 bis 0,43 je nach Probe. Bei der Überprüfung des linearen Zusammenhangs zwischen diesen beiden Werten lag der Pearson-Korrelationskoeffizient bei keiner Probe unter 0,95. Die somit für alle Proben als sehr stark ermittelte lineare Korrelation war zudem in allen Fällen hoch signifikant. Die genauen Ergebnisse zu den bestimmten linearen Zusammenhängen sind in Abbildung IV-2 dargestellt.

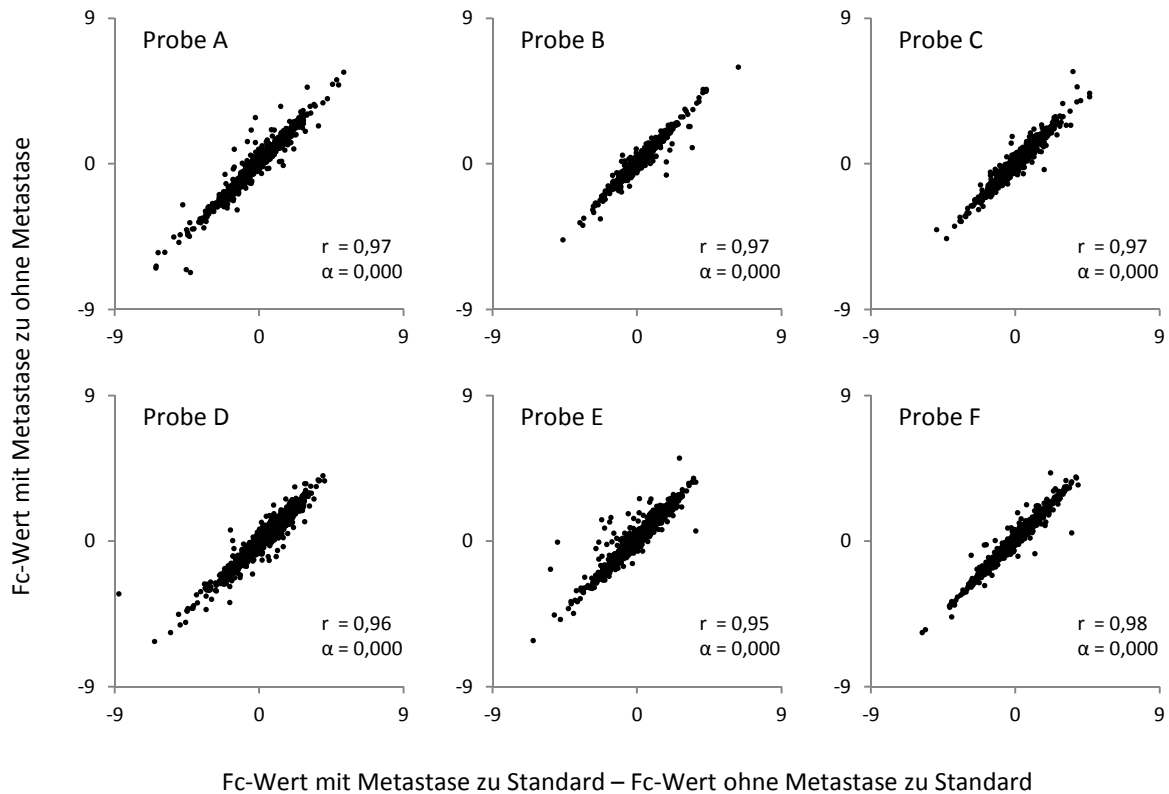


Abbildung IV-2. Pearson-Korrelationen der aus dem Verhältnis der Patientenprobe mit Metastase zu der ohne Metastase errechneten Fc-Werte zu den hierfür aus den beiden Fc-Werten der Patientenproben jeweils zum Standard errechneten Werten für alle Proteingruppen der Proben A bis F. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

1.1.3 Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression

Im Anschluss an die Identifizierung und Quantifizierung der Proteingruppen folgte ein Vergleich der Proteinexpression zwischen den ccRCC mit und ohne Metastasen. Hierzu dienten, nachdem der Standard validiert wurde, die Fc-Werte der Patientenproben zum Standard. Um eine ausreichende Patientenzahl zu gewährleisten, umfassten die statistischen Tests dabei nur die 1 139 Proteingruppen, für die in beiden Gruppen jeweils mindestens vier Patientenproben quantifiziert wurden.

Wie dem Diagramm in Abbildung IV-3 zu entnehmen ist, gab es 10 Proteingruppen, bei denen der mittels Limma ermittelte gemäßigte p-Wert unter 0,01 lag. Da diese Anzahl zu gering für die geplante Analyse auf angereicherte, biologische Motive war, erfolgte unter Vorbehalt eine Aufweichung des Grenzwertes. Somit ergaben sich insgesamt 55 Proteingruppen, deren gemäßiger p-Wert kleiner als 0,05 war. Hiervon erfüllten alle das zusätzliche Kriterium, dass sie im Vergleich zur anderen Gruppe um mindestens 50 % mehr oder weniger exprimiert wurden. Dies entspricht einer in Abbildung IV-3 ebenfalls eingezeichneten Differenz der Fc-Werte von

+/-0,58. Die 29 in der Gruppe ohne Metastasen bzw. 26 in der Gruppe mit Metastasen auf diese Weise als signifikant angereichert identifizierten Proteingruppen sind in Tabelle IV-1 aufgeführt. Erstere weisen eine negative Mittelwertsdifferenz auf, während diese bei den ccRCC mit Metastasen positiv ist, da der mittlere Fc-Wert der Patientenproben ohne Metastasen von dem der Gruppe mit Metastasen subtrahiert wurde.

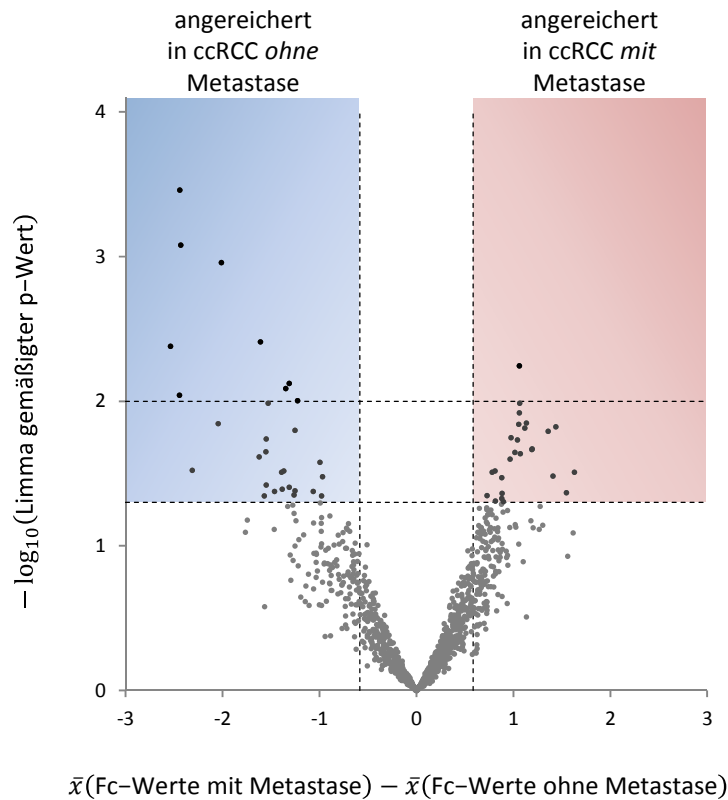


Abbildung IV-3. Volcano plot der negativen, dekadischen Logarithmen der mittels Limma errechneten gemäßigten p-Werte für die quantifizierten Proteingruppen gegen die Mittelwertsdifferenz der Fc-Werte zum Standard für den Vergleich zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC. (\bar{x} = arithmetischer Mittelwert)

Des Weiteren sind in Tabelle IV-1 die drei Proteine, die mit einer medianen FDR von 0 % bei einem delta-Wert von 0,273 im SAM als signifikant bei den ccRCC ohne Metastase vermehrt exprimiert ermittelt wurden, zusätzlich markiert. Von einer Verringerung des delta-Wertes wurde abgesehen, da dies neben der zusätzlichen Identifizierung zweier signifikanter Proteingruppen zu einem sprunghaften Anstieg der medianen FDR auf 35 % führte.

Für alle signifikant unterschiedlich exprimierten Proteingruppen sind in Tabelle IV-1 zusätzlich die dekadisch logarithmierten iBAQ-Werte, die Anzahl der quantifizierten Peptide, die für das jeweilige Protein spezifisch sind und der von diesen abgedeckte prozentuale Anteil an der gesamten Proteinsequenz angegeben. Insofern die Werte für die verschiedenen Proben nicht gleich waren, ist jeweils der minimale und maximale Wert aufgeführt.

Tabelle IV-1. Proteingruppen mit signifikant unterschiedlicher Proteinexpression zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC. Der gemäßigte p-Wert wurde mittels Limma berechnet. Zusätzlich im SAM mit einer medianen FDR von 0 % als signifikant unterschiedlich ermittelte Proteine sind durch ** nach dem Proteinnamen gekennzeichnet.

<i>Proteinname</i>	<i>Genname</i>	<i>UniProt ID</i>	<i>Mittelwertsdifferenz Fc-Werte</i>	<i>gemäßigter p-Wert</i>	<i>Anzahl spezifischer Peptide</i>	<i>Sequenzabdeckung [%]</i>	<i>log₁₀ (iBAQ-Wert)</i>
Haptoglobin; Haptoglobin alpha/beta chain	HP	P00738; P00739	1,63	0,031	5 - 11	16 - 31	8 - 9
Ig heavy chain V-I region HG3		P01743	1,55	0,043	1	9	7
Fascin	FSCN1	Q16658	1,44	0,015	3 - 4	7 - 10	6 - 7
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	P11413	1,41	0,033	5 - 8	9 - 16	7 - 8
Stathmin	STMN1	P16949	1,36	0,016	1 - 2	8 - 13	7 - 8
Antigen peptide transporter 1	TAP1	Q03518	1,19	0,021	1 - 2	2 - 3	5 - 7
Alpha-1-antichymotrypsin	SERPIN A3	P01011	1,19	0,022	7 - 10	17 - 29	8 - 9
Obg-like ATPase 1	OLA1	Q9NTK5	1,14	0,014	2	4 - 5	6 - 7
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	P12004	1,12	0,015	1 - 5	5 - 30	6 - 7
Protein PML	PML	P29590	1,07	0,023	2 - 5	3 - 7	6 - 7
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	P26641	1,07	0,010	6 - 9	14 - 23	7 - 8
Eukaryotic initiation factor 4A-II	EIF4A2	Q14240	1,06	0,012	1 - 3	3 - 8	6 - 7
Annexin A11/13	ANXA11/13	P50995; P27216	1,06	0,006	4 - 9	9 - 22	7 - 8
Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	Q01518	1,06	0,014	8 - 13	19 - 34	7 - 8
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	Q96AG4	1,04	0,019	3 - 4	9 - 12	7 - 8
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	1,02	0,023	10 - 17	13 - 27	7 - 8
F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	P47756	0,98	0,018	5 - 7	19 - 27	7 - 8
Transketolase	TKT	P29401	0,97	0,025	6 - 9	11 - 18	7 - 8
14-3-3 protein theta	YWHAQ	P27348	0,90	0,049	4 - 6	19 - 39	8
Endoplasmic reticulum resident protein 44	ERP44	Q9BS26	0,89	0,043	3 - 9	8 - 22	7 - 8
T-complex protein 1 subunit eta	CCT7	Q99832	0,88	0,034	6 - 11	12 - 23	7 - 8
Extended synaptotagmin-1	ESYT1	Q9BSJ8	0,88	0,047	1 - 5	1 - 6	6
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	0,81	0,049	3 - 8	12 - 52	8
T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	P50990	0,81	0,030	11 - 16	22 - 33	7 - 8
Ribonuclease inhibitor	RNH1	P13489	0,78	0,031	7 - 9	18 - 24	7 - 8
Hsp90 co-chaperone Cdc37	CDC37	Q16543	0,73	0,045	4 - 7	13 - 25	7 - 8
Nucleoside diphosphate kinase 3	NME3	Q13232	-0,97	0,033	2 - 3	16 - 24	7 - 8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2	NDUFA4L2	Q9NRX3	-0,98	0,045	3 - 4	29 - 38	7 - 9
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	P61604	-1,00	0,026	5 - 6	48 - 56	8 - 9

Proteinname	Genname	UniProt ID	Mittelwertsdifferenz Fc-Werte	gemäßiger p-Wert	Anzahl spezifischer Peptide	Sequenzabdeckung [%]	log ₁₀ (iBAQ-Wert)
Ferritin light chain	FTL	P02792	-1,07	0,042	1 - 3	4 - 20	8 - 9
Dynein light chain 2/1, cytoplasmic	DYNLL2/1	Q96FJ2; P63167	-1,23	0,010	1 - 2	8 - 33	7 - 8
Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	P28072	-1,25	0,016	4	17	7 - 8
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	P04179	-1,25	0,042	3 - 4	13 - 20	8 - 9
Acyl-coenzyme A thioesterase 13	ACOT13	Q9NPJ3	-1,26	0,044	1 - 3	9 - 21	6 - 8
Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	-1,31	0,008	7 - 10	39 - 62	8 - 9
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	P42765	-1,31	0,039	4 - 7	10 - 26	7 - 8
Transthyretin	TTR	P02766	-1,35	0,008	1 - 2	9 - 24	8
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	P19823	-1,37	0,030	3 - 8	4 - 12	7
Aminoacylase-1	ACY1	Q03154	-1,38	0,040	4 - 11	10 - 31	7 - 8
3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	BDH2	Q9BUT1	-1,39	0,031	3 - 5	14 - 27	7 - 8
Cytochrome c	CYCS	P99999	-1,47	0,042	2	21	7 - 8
Disabled homolog 2	DAB2	P98082	-1,53	0,010	2 - 5	3 - 8	6 - 7
Amine oxidase [flavin-containing] B	MAOB	P27338	-1,55	0,038	4 - 8	8 - 19	7 - 8
3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	HAAO	P46952	-1,55	0,018	1 - 2	4 - 7	6 - 7
Retinol-binding protein 5	RBP5	P82980	-1,55	0,022	1	7	7 - 8
Ribonuclease UK114	HRSP12	P52758	-1,57	0,045	3 - 6	27 - 58	8 - 9
Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	Q96KP4	-1,61	0,004	7 - 12	19 - 35	8 - 9
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	LRP2	P98164	-1,62	0,024	4 - 14	1 - 3	5 - 7
Ferritin heavy chain**	FTH1	P02794	-2,01	0,001	4 - 6	22 - 36	9 - 10
Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	BHMT	Q93088	-2,05	0,014	3 - 8	8 - 26	7 - 8
Glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM	P50440	-2,31	0,030	2 - 6	5 - 16	6 - 8
Amine oxidase [flavin-containing] A**	MAOA	P21397	-2,43	0,001	2 - 6	4 - 13	6 - 8
Cytochrome b5**	CYB5A	P00167	-2,44	0,000	3 - 4	32 - 39	8 - 9
Ketohexokinase	KHK	P50053	-2,45	0,009	2 - 5	6 - 15	7 - 9
Alpha-crystallin B chain	CRYAB	P02511	-2,54	0,004	4 - 6	23 - 43	8 - 10

1.1.4 Angereicherte, biologische Motive

Die mittels statistischer Tests auf signifikante Unterschiede untersuchten 1 139 Proteingruppen dienten bei der darauf folgenden funktionellen Analyse mit DAVID als Hintergrund. Hierbei wurden die 29 in der Gruppe ohne Metastasen und die 26 bei den ccRCC mit Metastasen laut Limma signifikant mehr exprimierten Proteine jeweils auf eine Anreicherung biologischer Motive geprüft. Im Anschluss fand eine Zusammenfassung im Ergebnis redundanter Annotationen mit Hilfe der Vorgruppierung durch das Functional Annotation Clustering statt. Insofern

eine konkretere Annotation wie z. B. Mitochondrienmembran alle Proteine einer allgemeineren Annotation, wie z. B. Mitochondrium abdeckte, erfolgte dabei eine Zusammenfassung unter der konkreteren Annotation. Die signifikantesten der so ermittelten Annotationen sind in Abbildung IV-4 nach dem für den jeweiligen Cluster, aus dem sie zusammengefasst wurden, durch DAVID berechneten Score sortiert. Ein großer Wert spricht für eine starke Anreicherung des jeweiligen Motivs. Zusätzlich ist für jede Annotation der negative dekadische Logarithmus der Wahrscheinlichkeit, dass keine Anreicherung vorliegt, angegeben. Wurden mehrere Annotationen vereinigt, diente der niedrigste p-Wert der Berechnung.

Die größte Bedeutung bei der Analyse der Annotationen für die ccRCC mit Metastasen rechnet DAVID der Reaktion auf insbesondere ungefaltete Proteine zu. Dieser biologische Prozess ist jedoch nicht signifikant angereichert, da die Wahrscheinlichkeit, dass keine Anreicherung vorliegt größer als 5 % ist. Dieses Kriterium erfüllen nur die Annotationen zellulärer Proteintransport und -lokalisierung und Membran von Zellorganellen, Kernhülle, die durch DAVID im zweiten Cluster als Prozess und Zellkompartiment zusammengefasst wurden.

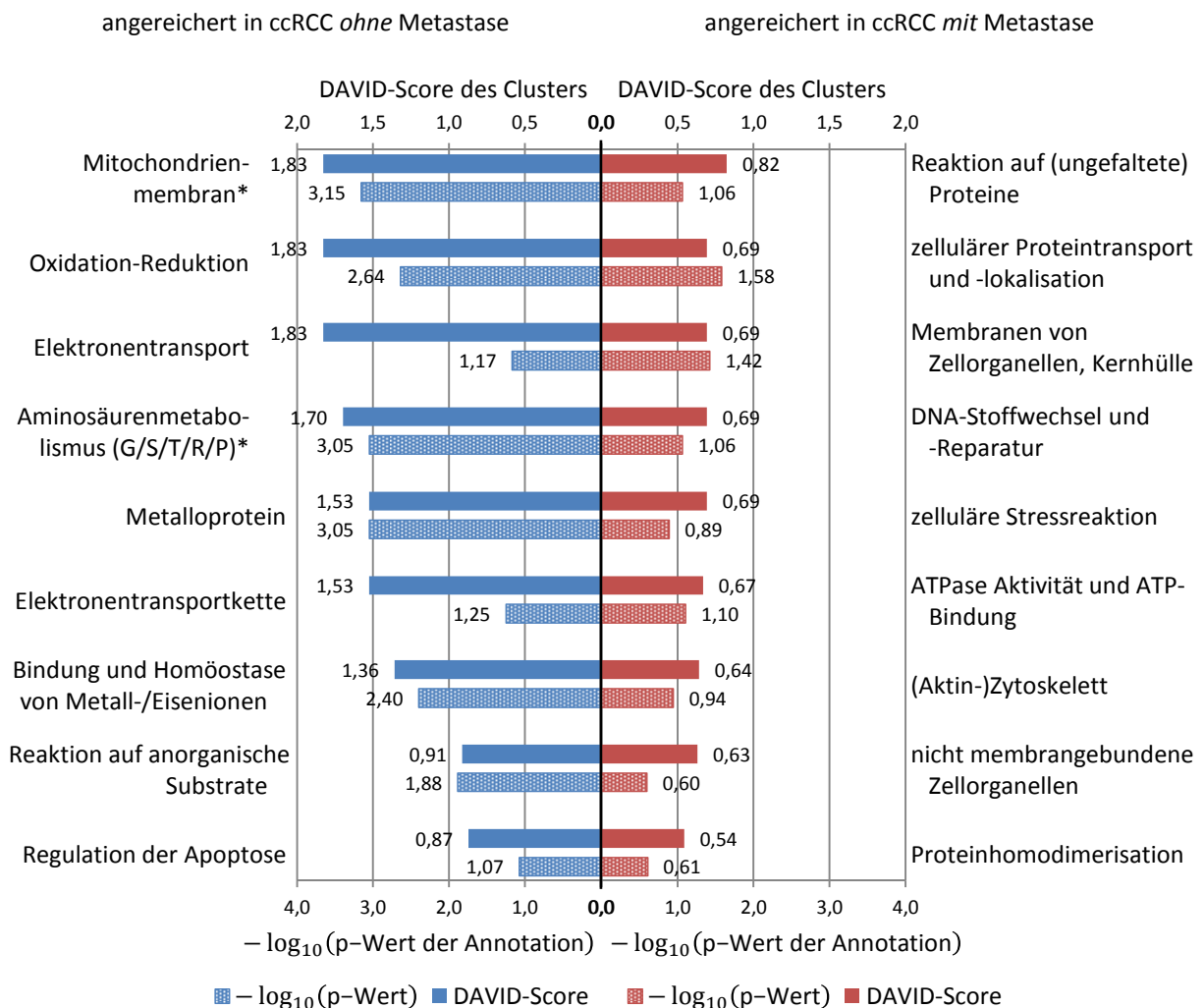


Abbildung IV-4. Im Vergleich zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC angereicherte biologische Motive. Die einzelnen Annotationen sind anhand des durch DAVID für den jeweiligen Cluster berechneten Scores sortiert. Zusätzlich ist für jede Annotation die Wahrscheinlichkeit dafür, dass keine Anreicherung vorliegt, in Form des negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes angegeben. Die Annotationsbezeichnungen sind mit einem * markiert, wenn der p-Wert nach Benjamini-Korrektur unter 0,05 lag.

Im Vergleich zu den metastasierenden ccRCC ergibt sich bei den nicht metastasierenden ccRCC eine deutlichere Anreicherung einiger Annotationen. So sind die meisten der in Abbildung IV-4 aufgeführten Motive in Bezug auf das 5 %-Niveau signifikant angereichert. Dies spiegelt sich in den vergleichsweise höheren DAVID-Scores wider. Die demnach am stärksten angereicherte Gruppe an Annotationen umfasst hierbei die an der Mitochondrienmembran stattfindenden Oxidationen und Reduktionen sowie den Elektronentransport. Des Weiteren ergibt die Analyse der in der Gruppe ohne Metastasen signifikant mehr exprimierten Proteine einen verstärkten Aminosäurenmetabolismus hinsichtlich Glycin, Serin, Threonin, Arginin und Prolin sowie eine Anreicherung von Proteinen, die der Bindung und Homöostase von Metall- insbesondere von Eisenionen zuzuordnen sind. Eine vermehrte Regulation der Apoptose konnte außerdem festgestellt werden, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass diese Anreicherung fälschlicherweise angenommen wird, über 5 % liegt.

In DAVID wird auch der Tatsache Rechnung getragen, dass mehrere Annotationen auf einmal anhand statistischer Tests auf eine signifikante Anreicherung geprüft werden. Neben dem p-Wert wird daher ein nach Benjamini korrigierter p-Wert angegeben. Dieser lag bei allen für die metastasierenden ccRCC genannten Annotationen über 0,05. Proteine der Mitochondrienmembran und des Aminosäurenmetabolismus von Glycin, Serin und Threonin sind bei den nicht metastasierenden ccRCC auch nach Benjamini-Korrektur unter den veränderten Proteinen signifikant angereichert.

1.2 Aminopeptidase N

Aus den durch die massenspektrometrische Analyse ermittelten, zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen erfolgte im Anschluss eine Auswahl interessanter Proteine, um deren Expression auch mittels IHC zu untersuchen. Zunächst diente Aminopeptidase N, auch CD13 genannt, der Prüfung, ob prinzipiell der Nachweis einer linearen Korrelation zwischen massenspektrometrischen Ergebnissen und IHC möglich ist. CD13 wurde für alle 12 ccRCC-Proben gemessen, aber es bestand kein signifikanter Unterschied bei dessen Expression zwischen den Vergleichsgruppen. Die Auswahl erfolgte zum einen aus dem rein praktischen Grund, dass ein entsprechender Antikörper bereits zur Etablierung zur Verfügung stand und zum anderen konnte gleichzeitig geprüft werden, ob IHC Profiler auch zur Auswertung membranärer Färbungen genutzt werden kann.

In Abbildung IV-5 ist für jedes ccRCC ein repräsentativer Ausschnitt aus der immunhistochemischen Färbung dem Ergebnis aus der massenspektrometrischen Analyse gegenüber gestellt.

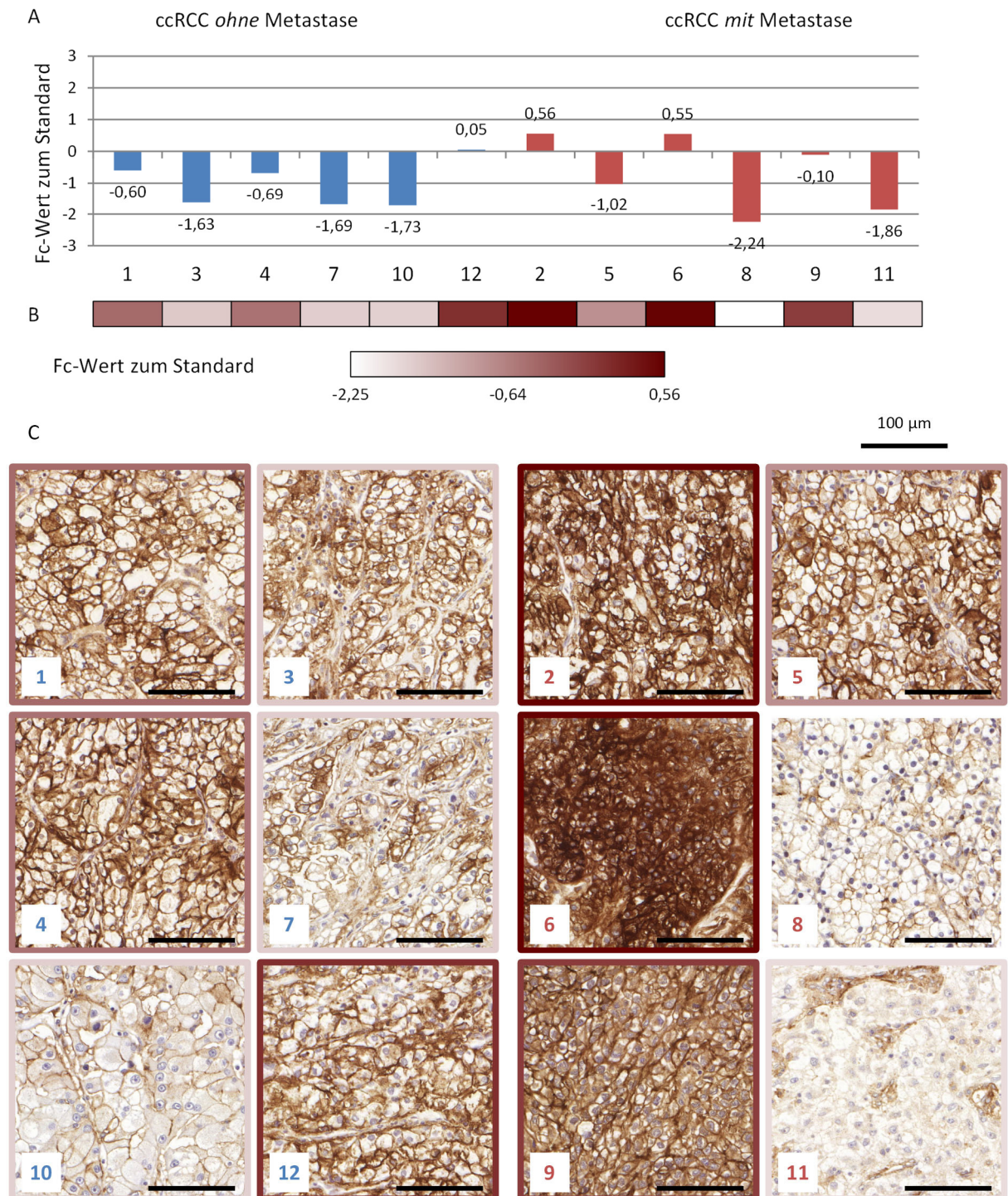


Abbildung IV-5. Expression der Amino-peptidase N bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für die 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Gruppenzugehörigkeit sortiert. Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

1.2.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

In der IHC konnte eine membranäre Expression von CD13 in den Tumorzellen bestätigt werden. Zusätzlich waren die Endothelzellen und teilweise auch Bindegewebszellen im Tumorstroma schwach bis mäßig positiv. Der stark gefärbte Bürstensaum an der apikalen Membran

der proximalen Nierentubuli im auf den meisten Tumorschnitten vorhandenen angrenzenden Normalgewebe unterstützte die Einschätzung der Färbeintensität bei der semiquantitativen Evaluation.

1.2.2 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

An die qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen von CD13 schloss sich neben der erwähnten semiquantitativen Evaluation eine Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ an. Für jede ccRCC-Probe wurde für beide Auswertverfahren eine Bewertungszahl nach Gleichung (4) bzw. (5) (siehe Kapitel III.7.3 bzw. III.7.4) berechnet. Anhand dieser fand eine Überprüfung der beiden Auswertmethoden hinsichtlich einer Korrelation statt. Wie Teil C der Abbildung IV-6 zu entnehmen ist, korrelierten die Ergebnisse hierbei mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,84 sehr stark und auch hoch signifikant.

Des Weiteren zeigt Abbildung IV-6, dass die Ergebnisse der IHC für CD13 unabhängig von der für diese verwendeten Auswertmethode stark und signifikant mit den Ergebnissen aus der massenspektrometrischen Analyse der ccRCC korrelierten. Der Pearson-Korrelationskoeffizient lag dabei bei mindestens 0,61.

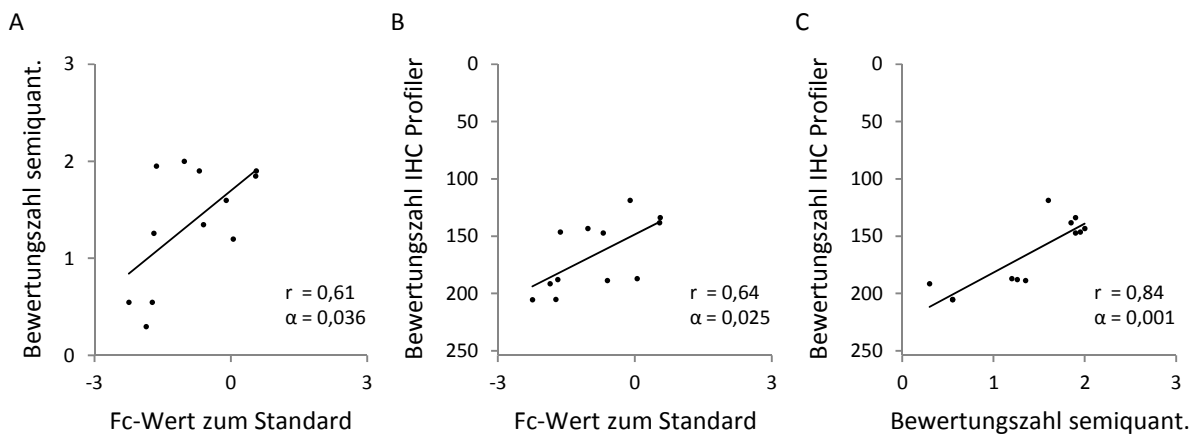


Abbildung IV-6. Pearson-Korrelationen der Ergebnisse zur Aminopeptidase N bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

1.3 Valosin-enthaltendes Protein

Mit einem Fc-Wert-Unterschied von 1,02 und einem gemäßigten p-Wert von 0,023 im Limma besteht im Gegensatz zu CD13 ein signifikanter Unterschied zum 5%-Niveau zwischen der Expression der transitional endoplasmic reticulum ATPase bei metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC. Diese ATPase wird auch Valosin-enthaltendes Protein (Valosin-containing protein, VCP) genannt. Aus der Gruppe der bei den ccRCC mit Metastasen signifikant mehr exprimierten Proteinen kristallisierte sich VCP für eine weitere Validierung heraus, da es bereits im Zusammenhang mit der Progression und Metastasierung einiger Tumorarten publiziert wurde. Zu dessen Expression bei metastasierenden ccRCC war hingegen zu diesem Zeitpunkt relativ wenig bekannt. Aufgrund der zahlreichen zellulären Funktionen, die für VCP beschrieben sind, steht es zusätzlich stellvertretend für die meisten der im Rahmen der funktionellen Analyse als angereichert ermittelten biologischen Motive. Hier sind insbesondere die Reaktion auf ungefaltete Proteine, der zelluläre Proteintransport, die zelluläre Proteinlokalisierung, der

DNA-Stoffwechsel, die DNA-Reparatur, die zelluläre Stressreaktion sowie die ATPase Aktivität und ATP-Bindung zu nennen.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse und der immunhistochemischen Färbungen von VCP ist in Abbildung IV-7 zu finden.

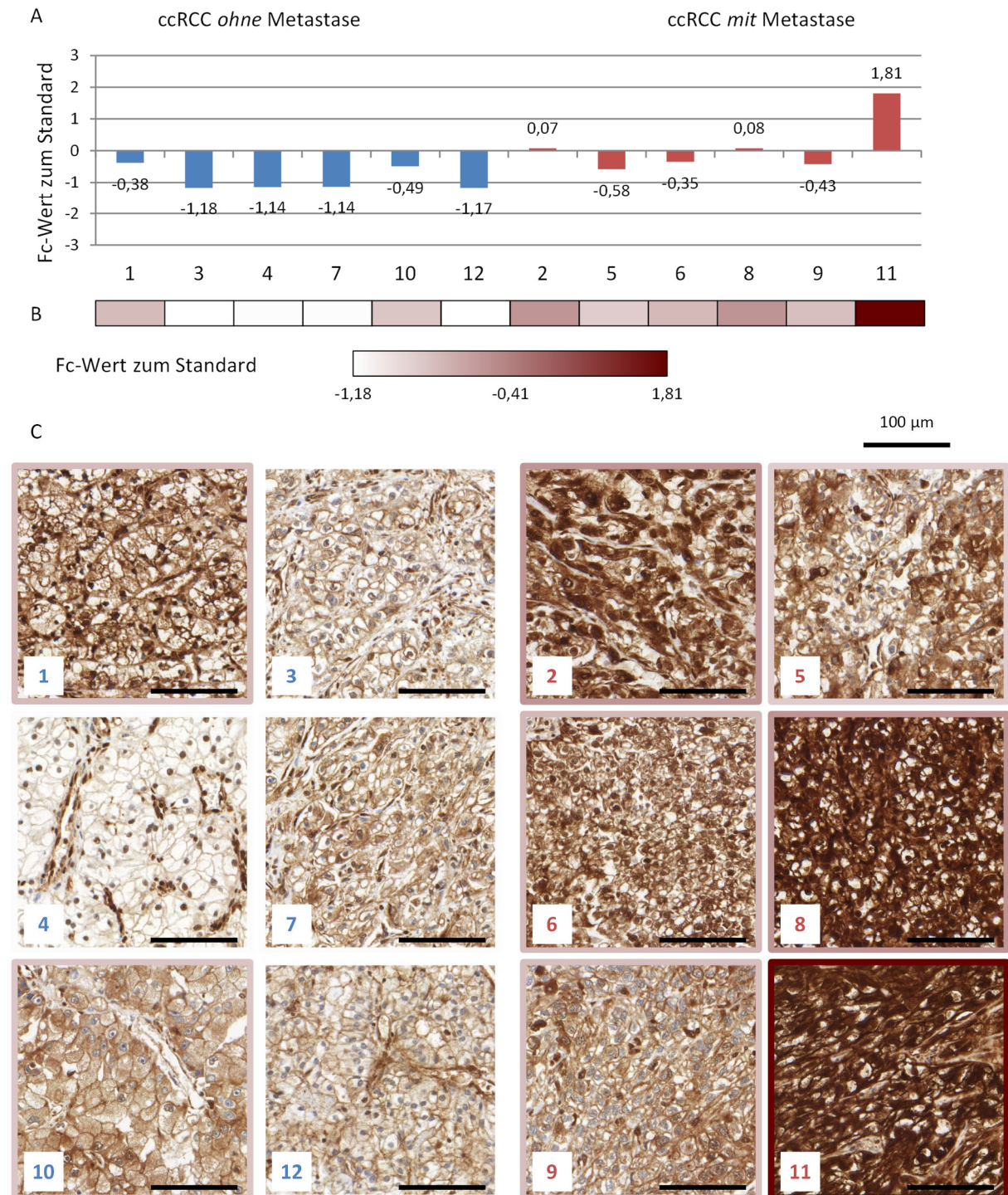


Abbildung IV-7. Expression des Valosin-enhaltenden Proteins bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für die 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Gruppenzugehörigkeit sortiert. Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

1.3.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Entsprechend der vielfältigen Funktionen des VCP von der Beteiligung an der DNA-Reparatur bis zum Abbau fehlerhaft gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum färbten sich sowohl das Zytoplasma als auch der Nukleus in der IHC. Bei den Tumorzellen entsprachen sich hierbei die Färbeintensitäten dieser beiden zellulären Lokalisationen nicht in allen Fällen. Es kamen sowohl ungefärbte oder schwach positive Zellkerne bei schwach bis mäßiger Färbung des Zytoplasmas als auch ein negatives Zytoplasma bei stark gefärbten Zellkernen vor. Bei stark gefärbtem Zytoplasma waren auch die Zellkerne meist stark positiv. Zusätzlich fiel bei der Beurteilung der Tumorareale auf, dass bei überwiegend schwacher bis mäßiger Färbeintensität die Invasionsfront, also der Bereich in dem der Tumor an das Normalgewebe grenzt, stärker gefärbt war. Neben den Tumorzellen waren auch Endothelzellen und Stromazellen im Tumorareal und die Tubuluszellen und die Glomerula im meist vorhandenen, angrenzenden normalen Nierengewebe gesamthaft stark positiv.

1.3.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

Die semiquantitative Evaluation der Tumorzellen in der IHC zeigte für VCP keine signifikanten Unterschiede zwischen den je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC. Wie aus Abbildung IV-8 ersichtlich wird, wichen die Ergebnisse für beide Gruppen allerdings voneinander ab. Bei den ccRCC mit Metastasen waren mit im Mittel 8,3 % der Fläche auch stark gefärbte Anteile zu finden, während sich die ccRCC ohne Metastasen maximal mäßig färbten. Zusätzlich unterschieden sich die beiden Gruppen im Anteil der mäßig gefärbten Zellfläche. Dieser war mit im Mittel 19,2 % ebenfalls bei der Gruppe mit Metastasen größer als die mittleren 12,5 % bei der Gruppe ohne Metastasen. Für letztere ergaben sich dem entsprechend größere Flächenanteile für die Färbeintensitäten 0 und 1. Zusammenfassend stellte sich in der semiquantitativen Evaluation der IHC eine nicht signifikante Tendenz zu einer stärkeren Expression von VCP durch die metastasierenden ccRCC im Vergleich zu den nicht metastasierenden heraus.

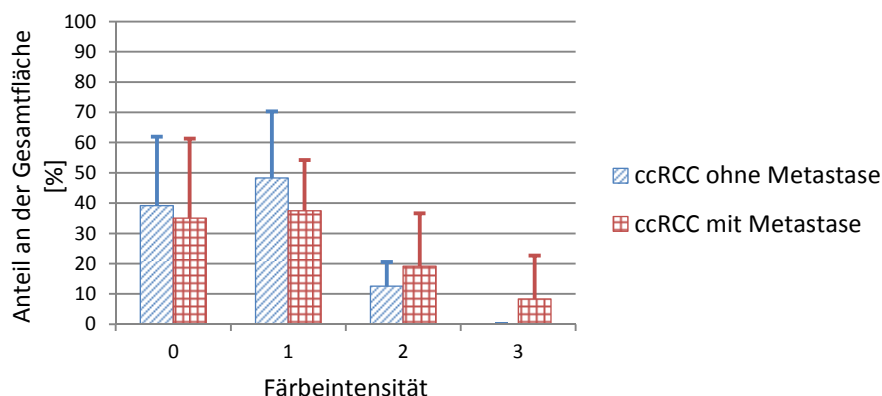


Abbildung IV-8. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von VCP bei den zwölf mittels Massenspektrometrie analysierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen.

Um zu prüfen, ob diese Tendenz aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht signifikant ist, wurden 33 weitere ccRCC immunhistochemisch mit dem Antikörper gegen VCP gefärbt. Dabei handelte es sich um 18 Fälle mit nachgewiesener Metastasierung, während die verbleibenden 15

Fälle auch im klinischen Verlauf frei von Metastasen durch das resezierte ccRCC waren. Das in Abbildung IV-9 dargestellte Ergebnis der semiquantitativen Evaluation dieser Färbungen ergab mit einem mittleren Flächenanteil von 44,7 % bzw. 53,3 % der mäßig und 36,7 % bzw. 28,9 % der stark gefärbten Areale eine insgesamt überwiegend mäßige bis starke Färbung dieser zusätzlichen Fälle. Im Vergleich zu den zwölf initial untersuchten ccRCC wiesen diese somit eine stärkere Färbeintensität auf. Die beiden Vergleichsgruppen unterschieden sich jedoch ebenfalls nicht signifikant voneinander. Die Verteilung der Fläche auf die vier Färbeintensitäten differierte nur gering und ohne einheitliche Tendenz. Beispielsweise lag der mittlere Flächenanteil der Gruppe ohne Metastase sowohl für die negativen als auch für die stark gefärbten Areale leicht über dem der Gruppe mit Metastasen.

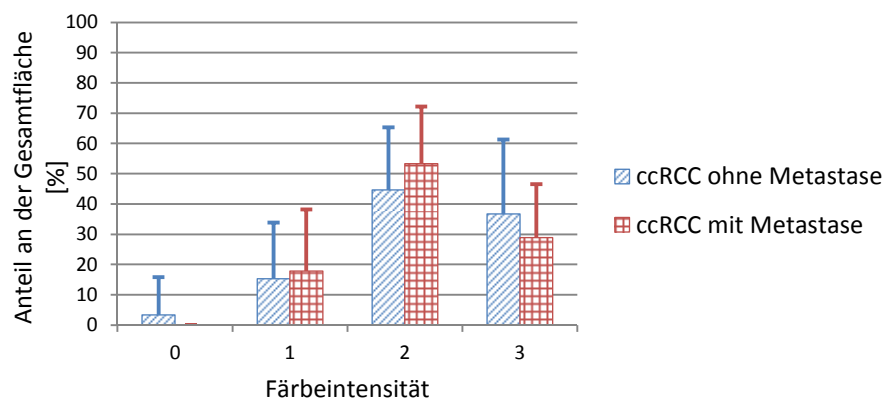


Abbildung IV-9. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von VCP bei 18 metastasierenden und 15 nicht metastasierenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen.

1.3.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen mit IHC Profiler bestätigte die in der semiquantitativen Evaluation der zwölf mittels Massenspektrometrie analysierten ccRCC festgestellte Tendenz zu einer stärkeren Expression von VCP bei der Gruppe mit Metastasen.

Zum einen ist dies anhand des Histogramms in Teil A der Abbildung IV-10 zu erkennen. Demnach traten bei den metastasierenden ccRCC alle Pixelintensitäten im Mittel gleich häufig auf. Die relativ große Standardabweichung im Bereich der dunklen Pixel ergab sich durch Fälle mit einem deutlich größeren Anteil an dunklen Pixeln. Bei den nicht metastasierenden ccRCC waren helle Pixel im Mittel hingegen häufiger als die bei dieser Gruppe selten detektierten dunklen Pixel.

Zum anderen wird die stärkere Positivität bei den Färbungen der ccRCC mit Metastasen auch in den berechneten Bewertungszahlen deutlich. Hier spiegelt sich der beschriebene Unterschied in den relativen Häufigkeiten der dunklen Pixelintensitäten in dem signifikant kleineren Mittelwert von 135,14 bei der Gruppe mit Metastasen im Vergleich zu 172,52 bei der Gruppe ohne Metastasen (siehe Teil B der Abbildung IV-10) wider.

Wenn auch nicht in Bezug auf die absoluten Werte für den prozentualen Flächenanteil, so entspricht die Einteilung durch IHC Profiler zumindest der Tendenz nach, dem bei der semiquantitativen Evaluation ermittelten Ergebnis. Bei der Teil C der Abbildung IV-10 zu entnehmenden Verteilung der Fläche auf die vier Färbegrade durch IHC Profiler ergab sich mit im Mit-

tel 25,4 % für mäßig bzw. 22,9 % für stark bei der Gruppe mit Metastasen im Vergleich zu 19,0 % bzw. 7,1 % bei der Gruppe ohne Metastasen ebenfalls ein größerer Flächenanteil dieser Intensitäten bei den ccRCC mit Metastasen. Dem entsprechend lagen die mittleren Flächenanteile der Färbegrade 0 und 1 für die nicht metastasierenden ccRCC über denen der metastasierenden. Die beschriebene Tendenz erwies sich bei einer Auswertung mit IHC Profiler für die Färbegrade 0 und 2 als signifikanter Unterschied. Die vergleichsweise größere Differenz der Mittelwerte für Färbegrad 3 ist aufgrund der starken Streuung bei der Gruppe mit Metastasen nicht signifikant.

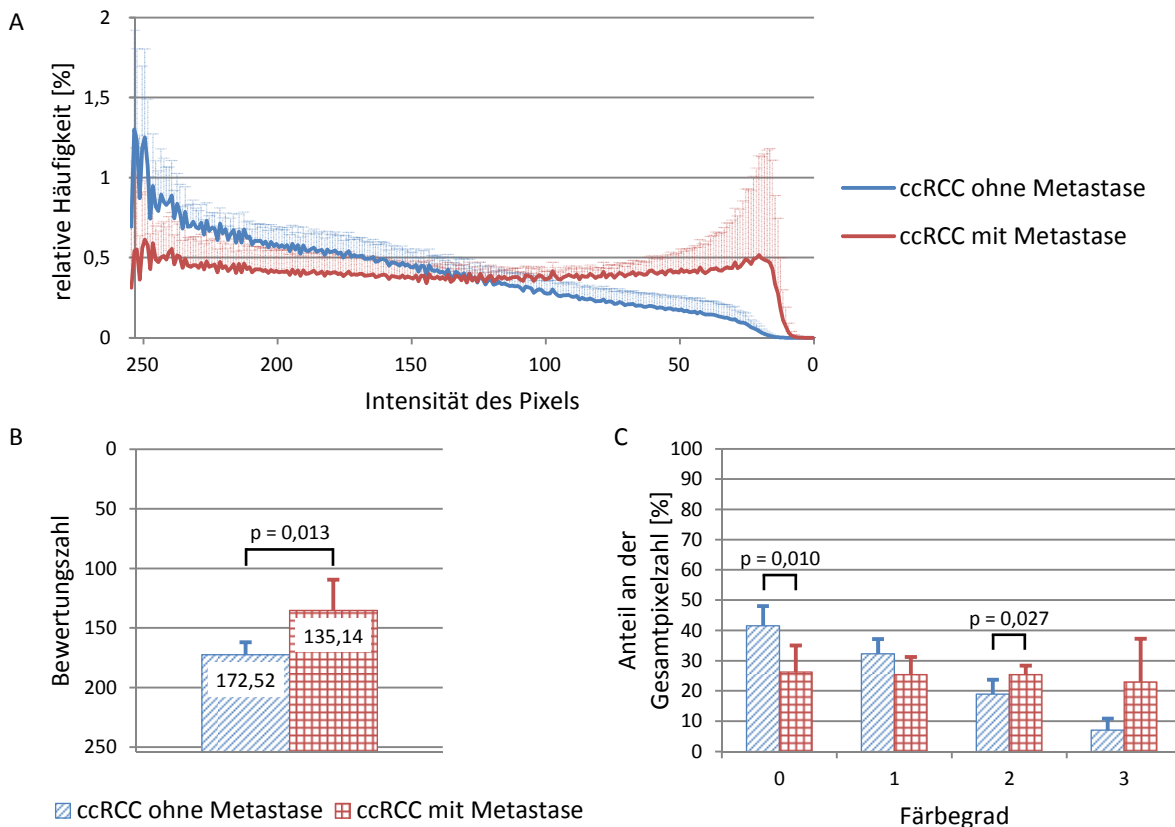


Abbildung IV-10. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von VCP mit IHC Profiler für die zwölf mittels Massenspektrometrie analysierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen für metastasierende und nicht metastasierende ccRCC. (p = zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz) C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. (p = zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz)

Ferner ist Abbildung IV-11 das Ergebnis der Auswertung mit IHC Profiler der zusätzlichen mit dem Antikörper gegen VCP gefärbten 33 Fälle zu entnehmen. Sowohl das Histogramm mit den mittleren relativen Häufigkeiten der Pixelintensitäten 254 bis 0 in Teil A als auch die Mittelwerte der Bewertungszahlen in Teil B und die Verteilungen der Gesamtfläche auf die vier Färbegrade in Teil C sind hierbei für die beiden Vergleichsgruppen nahezu identisch. Äquivalent zu den Ergebnissen der semiquantitativen Evaluation zeigte sich im Vergleich zur Auswertung der zwölf initial untersuchten ccRCC mit IHC Profiler auch hier eine stärkere Färbung der 33 zusätzlich gefärbten Fälle. Mit einem Mittelwert von 26,1 % bzw. 29,8 % für die mäßig und 34,1 % bzw. 34,8 % für die stark gefärbten Anteile lassen sich somit bei beiden Gruppen im Mittel über die Hälfte der Pixel diesen beiden Intensitäten zuordnen.

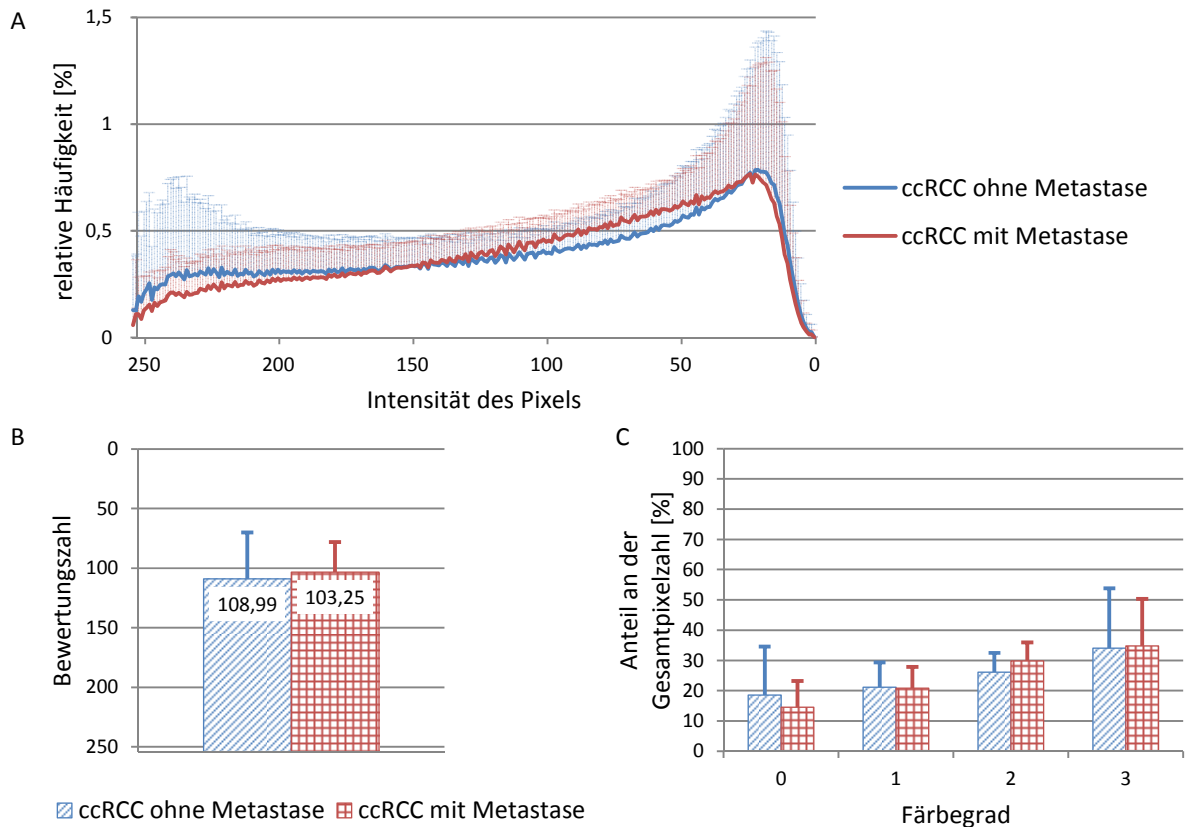


Abbildung IV-11. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von VCP mit IHC Profiler für die 18 metastasierenden und 15 nicht metastasierenden klarzelligen Nierenzellkarzinome, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen für metastasierende und nicht metastasierende ccRCC. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

1.3.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Im vorausgehenden Abschnitt zur Auswertung der Färbungen von VCP mit IHC Profiler wurde bereits ein Vergleich zu den Ergebnissen der semiquantitativen Evaluation gezogen. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse beider Auswertverfahren ließ sich auch statistisch nachweisen. Wie Teil C der Abbildung IV-12 und Abbildung IV-13 zeigen, korrelierten diese mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,71 für die zwölf initial untersuchten ccRCC bzw. einem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho von 0,64 für die zusätzlichen 33 Fälle stark und hoch signifikant miteinander.

Bei einem Vergleich der beiden Auswertmethoden jeweils mit der massenspektrometrischen Analyse stellte sich heraus, dass die Ergebnisse der Auswertung mit IHC Profiler deutlich stärker mit jenen aus der Massenspektrometrie korrelierten als die Ergebnisse der semiquantitativen Evaluation. Die Korrelation war für erstere sehr stark und hoch signifikant, für letztere ergab sich nur eine mittlere Korrelation, die gerade noch signifikant war. Die genauen Werte sind Teil A und B der Abbildung IV-12 zu entnehmen.

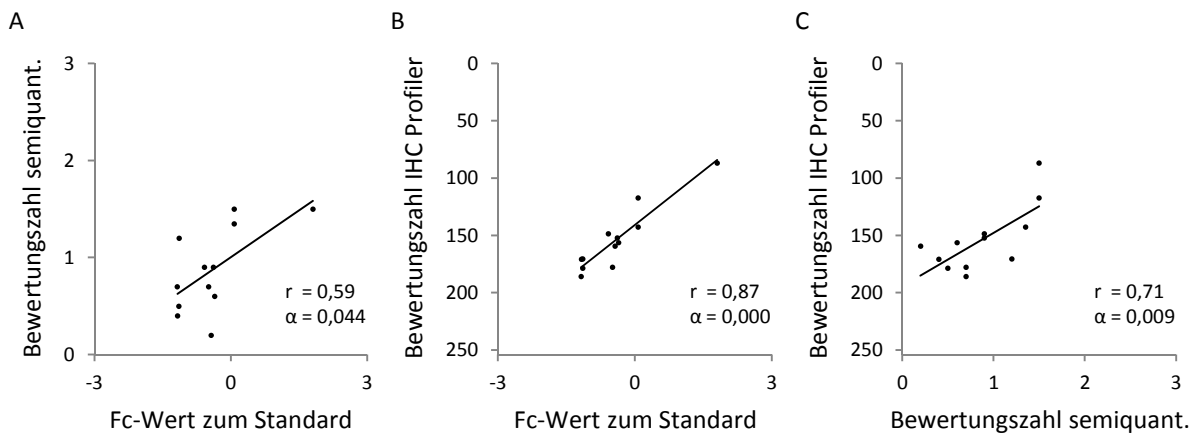


Abbildung IV-12. Korrelationen der Ergebnisse zu VCP bei den zwölf mittels Massenspektrometrie analysierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semi-quantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). (r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, α = zweiseitiges Signifikanzniveau) C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

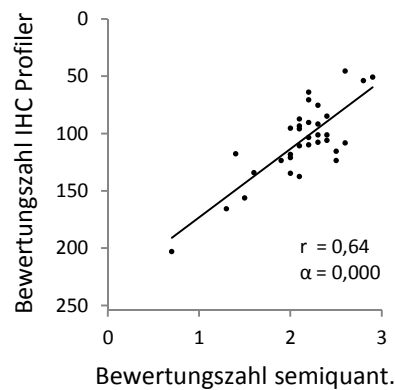


Abbildung IV-13. Korrelation zwischen den beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden bei den Färbungen von VCP bei den 33 klarzelligen Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. (r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

1.4 Unspezifische cytosolische Dipeptidase 2

Aus den neun bei den ccRCC ohne Metastasen mit einem gemäßigten p-Wert unter 0,01 im Limma signifikant mehr exprimierten Proteinen fiel die Wahl auf die unspezifische cytosolische Dipeptidase 2 (cytosolic non-specific dipeptidase, CNBP2). Die Differenz der mittleren Fc-Werte betrug -1,61. Die Auswahl erfolgte, da publizierte Angaben zur Expression von CNBP2 im Kontext mit Nierenzellkarzinomen einige Fragen offen lassen. So wurde zum einen eine höhere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Nierengewebe (OKAMURA et al., 2008; PERROUD et al., 2009; WHITE et al., 2014) und zum anderen eine gleichzeitige Abnahme der Expression mit zunehmendem Tumorgeschichte beschrieben (PERROUD et al., 2009). Zur Expression der CNBP2 bei metastasierenden Nierenzellkarzinomen wurden keine Publikationen gefunden. Aus diesem Grund diente die IHC der Überprüfung der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse. Die Resultate beider Verfahren sind in Abbildung IV-14 dargestellt.

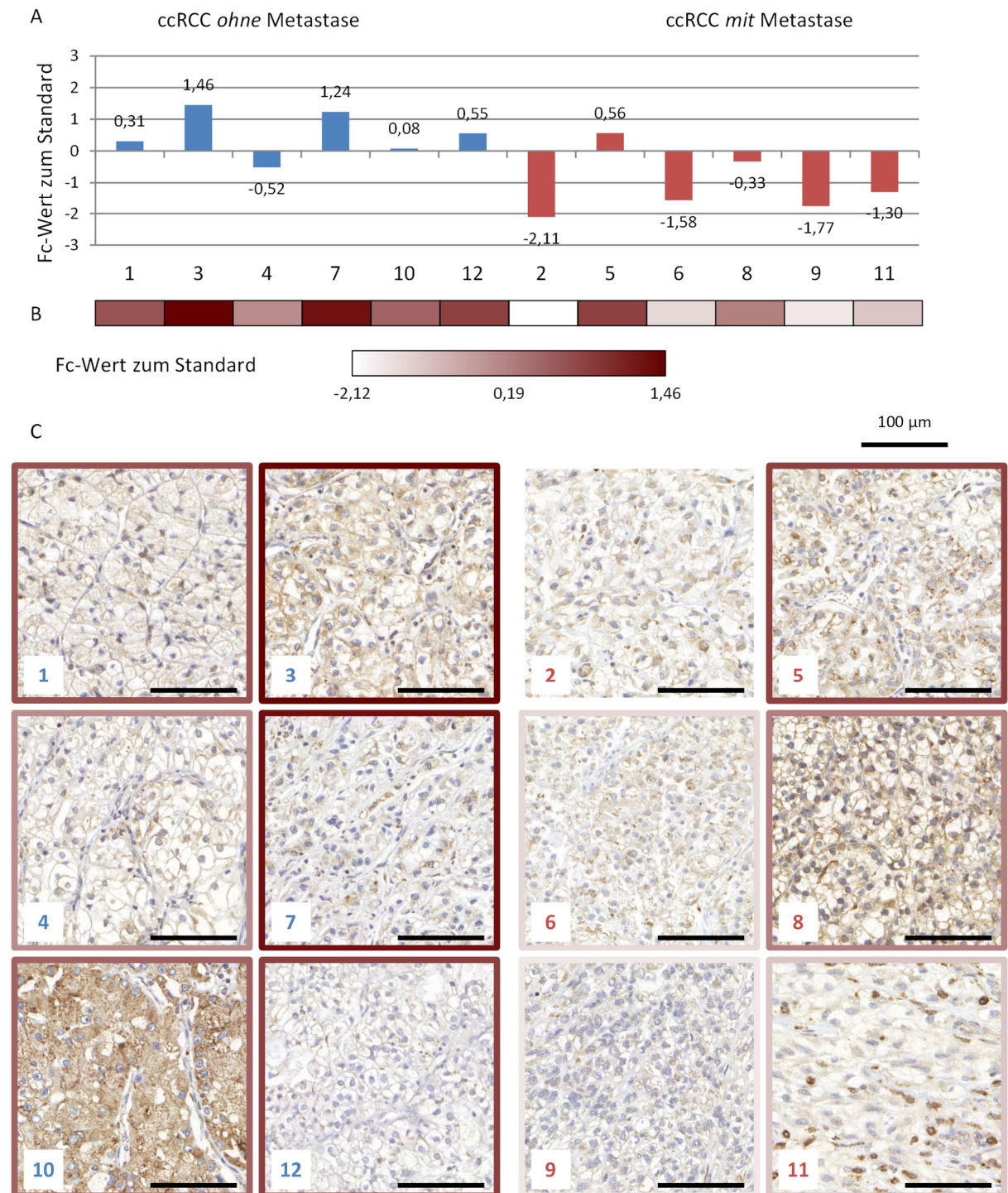


Abbildung IV-14. Expression der unspezifischen cytosolischen Dipeptidase 2 bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für die 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Wertes. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Gruppenzugehörigkeit sortiert. Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 10 µm.)

1.4.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Das Zytoplasma der Tumorzellen zeigte meist eine schwache bis mäßige Positivität für CNDP2 in der IHC. Vereinzelt kamen auch stark gefärbte Zellen vor. Das Tumorstroma war hingegen weitestgehend negativ. Jedoch traten im Bereich des Tumorstromas vereinzelt Zellinfiltra-

te durch stark CNDP2-positive Zellen auf. Als interne Kontrolle dienten die auf den meisten Schnitten vorhandenen normalen Nierentubuli, deren Epithelzellen schwach bis mäßig gefärbt waren.

1.4.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

Aufgrund der bei der qualitativen Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen festgestellten, im Vergleich zu den Färbungen anderer Proteine insgesamt schwächeren Positivität der Tumorzellen für CNDP2 erfolgte die semiquantitative Evaluation dieser anhand einer adaptierten Einteilung der Färbeintensitäten. Färbeintensität 3 entsprach hierbei bereits einer mäßigen Färbung nach der in Kapitel III.7.2 beschriebenen Einteilung. Die Ergebnisse aus der semiquantitativen Evaluation unter Berücksichtigung dieser modifizierten Einteilung sind in Abbildung IV-15 dargestellt. Die Mittelwerte für die prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten für die metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC wichen dabei insbesondere im Verhältnis zur großen Streuung innerhalb der jeweiligen Gruppe nur gering voneinander ab. Daher konnte bei keiner Färbeintensität ein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen nachgewiesen werden.

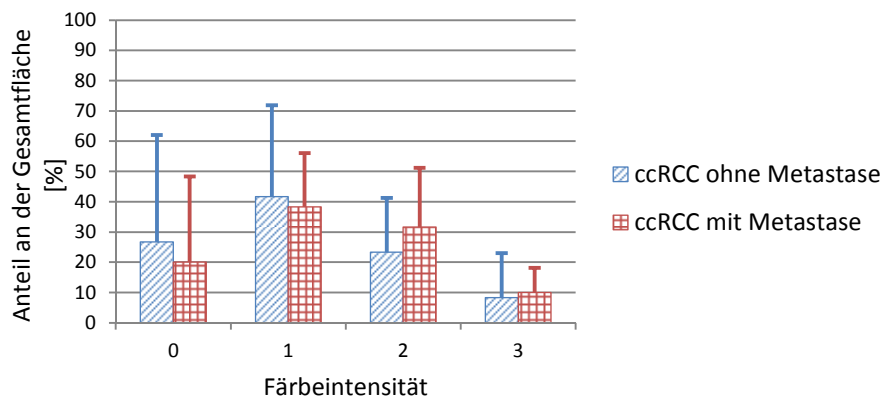


Abbildung IV-15. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von CNDP2 bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier, für die Auswertung von CNDP2 modifizierten Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen.

1.4.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Eine Adaption der Färbegrade an die Ausprägung der jeweiligen Färbung ist in IHC Profiler nicht möglich. Wie in Teil C der Abbildung IV-16 ersichtlich wird, traten bei der Färbung von CNDP2 demnach fast ausschließlich Pixel mit Intensitäten der Färbegrade 0 und 1 auf. Hierbei lag sowohl der Mittelwert der metastasierenden als auch der nicht metastasierenden ccRCC für den Färbegrad 0 bei über 85 %. Nicht nur die Verteilung der Gesamtpixelzahl auf die vier Färbegrade, sondern dem entsprechend auch die Mittelwerte der relativen Häufigkeiten der Pixelintensitäten 254 bis 0 und die Mittelwerte der für jeden Fall berechneten Bewertungszahlen waren für CNDP2 bei den beiden Vergleichsgruppen annähernd kongruent. (siehe Teil A und B der Abbildung IV-16)

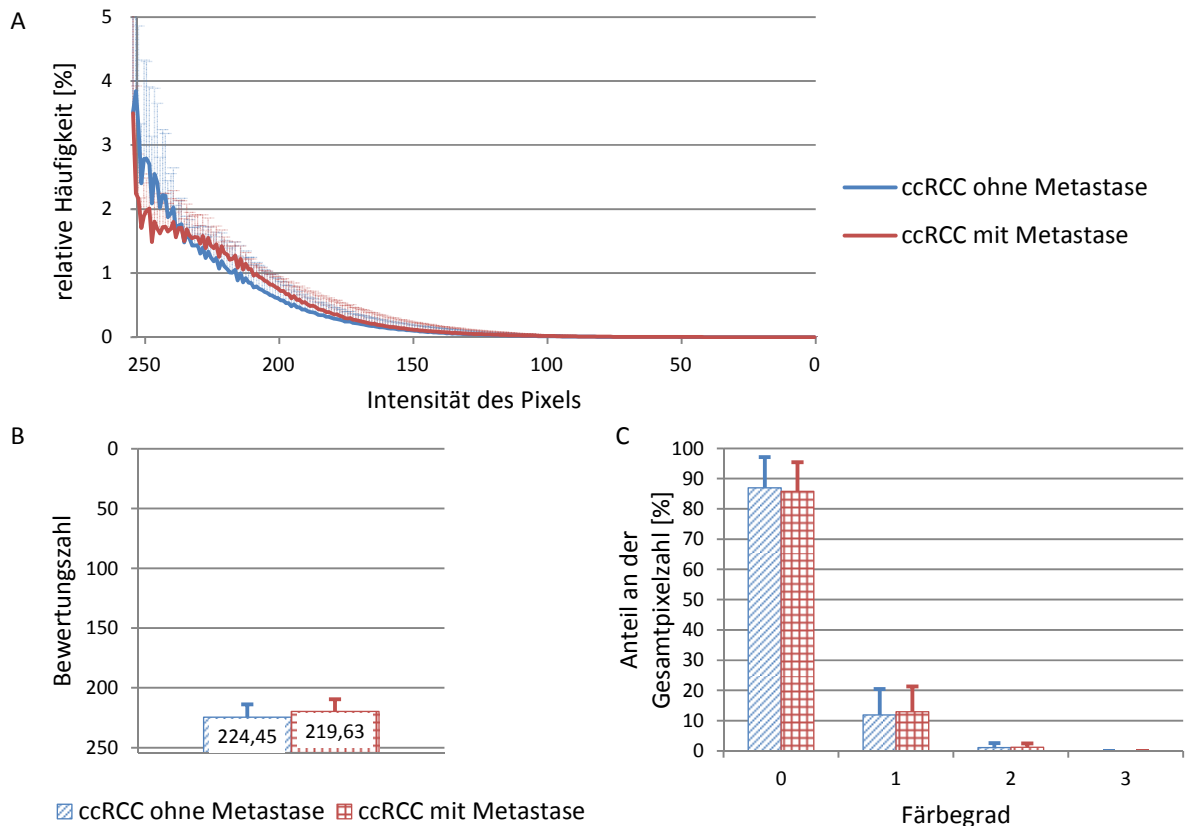


Abbildung IV-16. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CNDP2 mit IHC Profiler für die klarzelligen Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen für metastasierende und nicht metastasierende ccRCC. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

1.4.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Die Resultate der Tests auf Korrelationen zwischen den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie und der IHC sowie zwischen den verschiedenen Auswertmethoden für die IHC sind für CNDP2 in Abbildung IV-17 dargestellt. Während durch die massenspektrometrische Analyse ein signifikanter Unterschied bei der Expression von CNDP2 bei ccRCC in Abhängigkeit von einer Metastasierung statuiert wurde, konnte ein solcher weder bei der semiquantitativen Evaluation noch bei der Auswertung mit IHC Profiler in der IHC festgestellt werden. Daher überrascht es nicht, dass keine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen dieser Methoden bestand. (siehe Teil A und B der Abbildung IV-17)

Des Weiteren ergibt sich aus Teil C der Abbildung IV-17, dass die beiden zur Auswertung der IHC verwendeten Verfahren im Falle der CNDP2 mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,49 eine mittlere Korrelation aufwiesen. Diese war allerdings nicht signifikant.

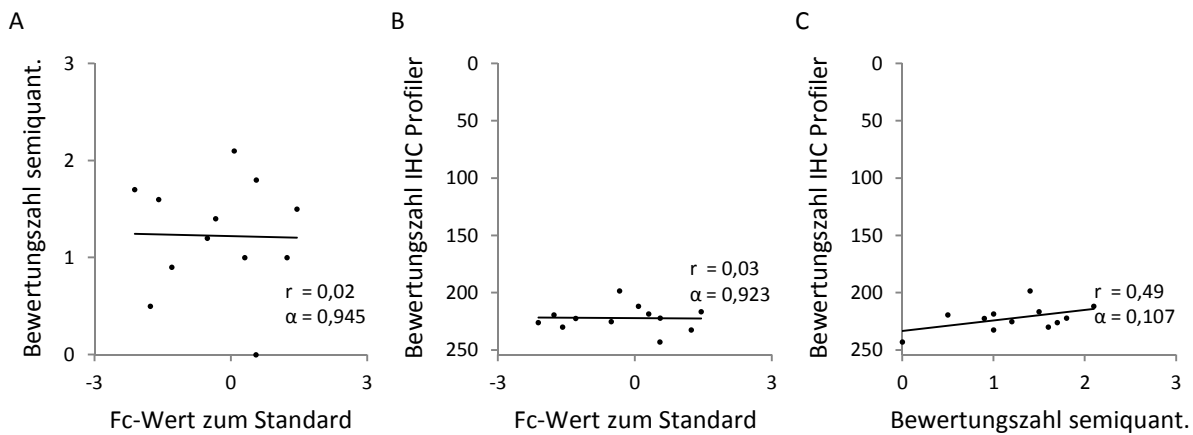


Abbildung IV-17. Pearson-Korrelationen der Ergebnisse zu CNDP2 bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluierung (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

2 Vergleich zwischen chRCC und RO

2.1 Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse

Für den Vergleich zwischen chromophobem Nierenzellkarzinom und renalem Onkozytom erfolgte die massenspektrometrische Analyse von sechs fraktionierten Proben, wobei jede Probe zu gleichen Teilen aus dem Probenmaterial eines chromophoben Nierenzellkarzinoms, eines renalen Onkozytoms und dem Standard bestand. Die genaue Zuordnung der einzelnen Patientenproben zu den analysierten Proben ist in Teil B und die Zusammensetzung des Standards in Teil A der Abbildung III-5 (siehe Seite 35) dargestellt.

2.1.1 Identifizierung und Quantifizierung durch MaxQuant

Anhand der je nach Probe zwischen 6 419 und 15 129 durch die Analyse der Massenspektren in MaxQuant identifizierten Peptide ergab sich auf Proteinebene die Identifikation von insgesamt 4 248 verschiedenen Proteingruppen. Diese bestanden zu 90 % aus nur einem Protein. Daher wird bei der nachfolgenden Darlegung der Ergebnisse zur relativen Quantifizierung der Proteingruppen vereinfachend von Proteinen gesprochen.

Für wie viele Proteine in den einzelnen Proben das Verhältnis zwischen dem chRCC und dem RO quantifiziert werden konnte, ist Abbildung IV-18 zu entnehmen. Eine Quantifizierung erfolgt nur bei einer ausreichenden Qualität des Massenspektrums. Daher konnten ein Teil der Proteine zwar identifiziert, aber nicht quantifiziert werden. Ferner hängen die Identifizierung und die Quantifizierung von Proteinen bei einer massenspektrometrischen Analyse von vielen Faktoren ab. Als Folge werden nicht immer gleich viele und zwischen den Proben teilweise unterschiedliche Proteine identifiziert und quantifiziert. Für insgesamt 3 116 verschiedene Proteine konnte in mindestens einer Probe das Verhältnis zwischen chRCC und RO quantifiziert werden. Hierbei erfolgte bei 30 % der Proteine eine Quantifizierung in allen sechs Proben. Ein von der zufälligen Probenpaarung unabhängiger Vergleich zwischen den beiden Neoplasien wird durch die Verhältnisse der zwölf Patientenproben jeweils zum Standard möglich. Das Verhältnis zum Standard konnte, wie ebenfalls in Abbildung IV-18 dargestellt ist, für mindestens eine Patientenprobe bei insgesamt 3 126 verschiedenen Proteinen bestimmt werden. Die Abweichung

von der Anzahl der quantifizierten Verhältnisse zwischen den Patientenproben ergibt sich durch 70 Proteine, bei denen in einer Probe bzw. bei einem Protein davon auch in zwei Proben nicht alle drei möglichen Verhältnisse zwischen den unterschiedlich gelabelten Anteilen quantifiziert wurden. Dabei wurde in 56 Fällen nur das Verhältnis zwischen dem leicht und medium gelabeltem Probenanteil ermittelt. Für 1 635 Proteine erfolgte eine gleichzeitige Quantifizierung des Verhältnisses zum Standard sowohl für mindestens vier der sechs chRCC-Proben als auch für mindestens vier der sechs RO-Proben. Dies entspricht gut der Hälfte aller Proteine, bei denen eine Quantifizierung über den Standard möglich war.

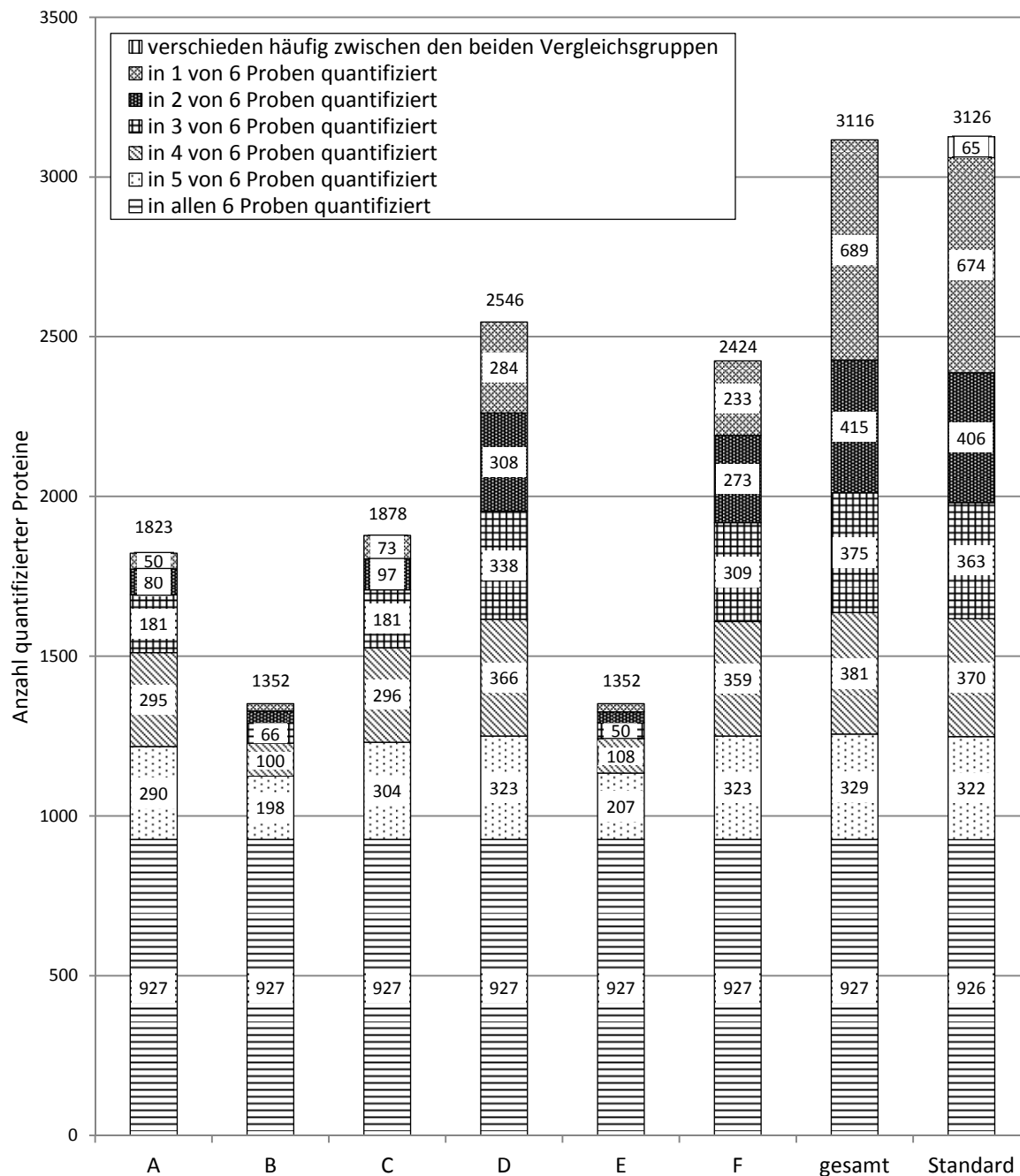


Abbildung IV-18. Anzahl der Proteine für jede Probe (A-F), bei denen das Verhältnis zwischen der enthaltenen chromophoben Nierenzellkarzinomprobe und der renalen Onkozytomprobe quantifiziert wurde. Unter gesamt ist die Gesamtzahl aller unterschiedlichen Proteine aufgetragen, für welche mindestens ein solches Verhältnis in den Proben A-F ermittelt werden konnte. Die angegebenen Häufigkeiten sind danach unterteilt, in wie vielen der sechs Proben A-F diese Quantifizierung zwischen chRCC- und RO-Probe für ein jeweiliges Protein möglich war. (Die bei der Unterteilung nicht angegebenen Anzahlen waren kleiner als 50.) Analog fasst Standard die Häufigkeit aller Proteine zusammen, für die eine Quantifizierung der Patientenprobe zum Standard durchgeführt werden konnte. Die Unterteilung der Häufigkeit erfolgte in diesem Fall danach, mit wie vielen Patientenproben je Gruppe das Verhältnis zum Standard quantifiziert werden konnte.

2.1.2 Validierung des Standards

Nach Gleichung (3) (siehe Kapitel III.4.2) fand eine Überprüfung des für die chromophoben Nierenzellkarzinome und renalen Onkozytome eingesetzten Standards statt. Der hierbei für jede Proteingruppe einer jeden Probe aus dem Verhältnis zwischen chRCC und RO berechnete Fc-

Wert wich dabei mit einer Standardabweichung von 0,18 bis 0,41 im arithmetischen Mittel aller Proteingruppen einer Probe um einen Betrag von 0,01 bis 0,10 je nach Probe von dem hierfür aus der Differenz der Fc-Werte der beiden Patientenproben jeweils zum Standard errechneten Wert ab. Wie aus den Ergebnissen zum linearen Zusammenhang zwischen diesen beiden Werten in Abbildung IV-19 ersichtlich wird, war die Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von mindestens 0,93 in allen Fällen sehr stark und außerdem hoch signifikant.

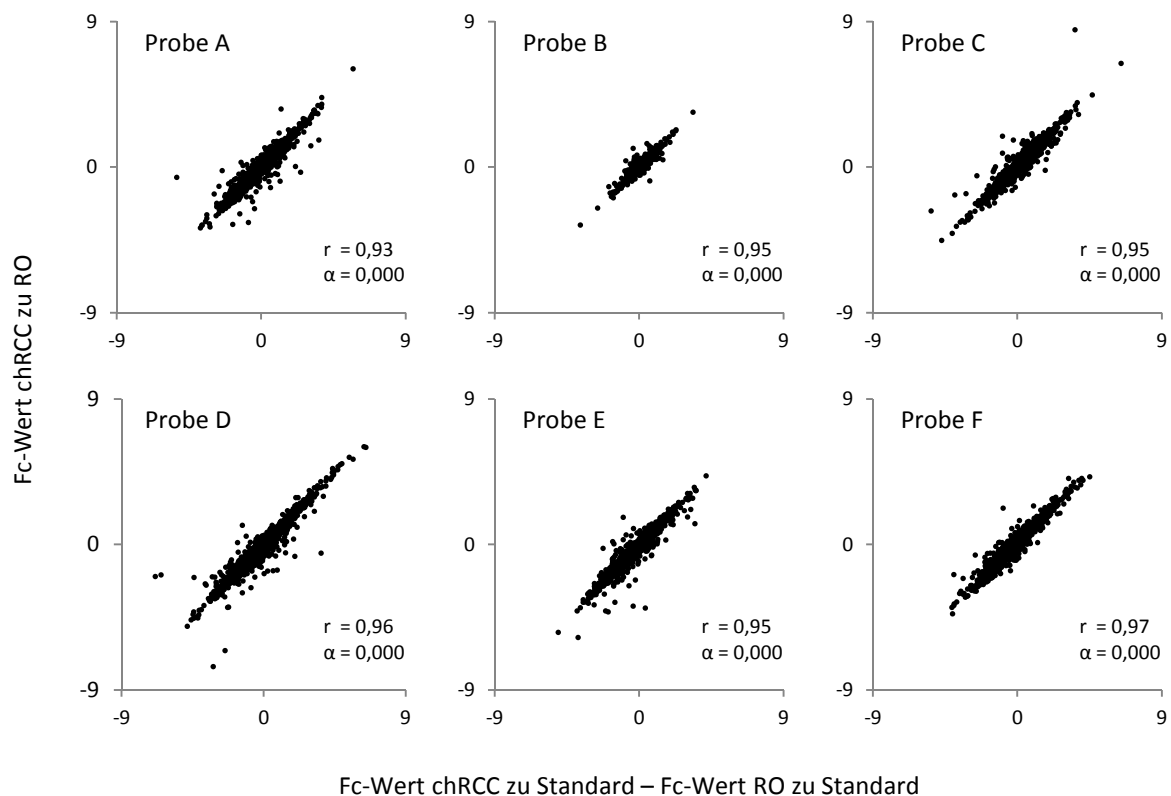


Abbildung IV-19. Pearson-Korrelationen der aus dem Verhältnis zwischen chromophobem Nierenzellkarzinom und renalem Onkozytom errechneten Fc-Werte zu den hierfür aus den beiden Fc-Werten des chromophoben Nierenzellkarzinoms und des renalen Onkozytoms jeweils zum Standard errechneten Werten für alle Proteingruppen der Proben A bis F. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

2.1.3 Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression

Nach der Validierung des Standards erfolgte ein Vergleich der Proteinexpression zwischen den chRCC und RO anhand der Fc-Werte der Patientenproben zum Standard. Hierbei wurden die verwendeten statistischen Tests nur auf die 1 635 Proteingruppen, bei denen dieser Fc-Wert für mindestens vier der sechs Patientenproben pro Gruppe vorlag, angewendet.

Bei 104 dieser Proteingruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den chRCC und RO mittels Limma festgestellt werden. Die Grenze für den gemäßigten p-Wert lag hierbei, wie Abbildung IV-20 zu entnehmen ist, bei 0,01. Wie in dem Diagramm ersichtlich wird, beinhalteten alle somit als signifikant ermittelten Unterschiede eine Differenz der mittleren Fc-Werte der beiden Gruppen von mindestens 0,58, was einer Erhöhung um mindestens 50 % zur Vergleichsgruppe entspricht. Von den 104 Proteingruppen waren 52 bei den chRCC und ebenfalls 52 bei den RO angereichert. Sie sind in Tabelle IV-2 aufgelistet. Da der mittlere Fc-Wert der RO von dem der chRCC subtrahiert wurde, lässt eine Mittelwertsdifferenz größer Null auf eine An-

reicherung in den chRCC und eine kleiner Null auf eine vermehrte Expression in den RO schließen.

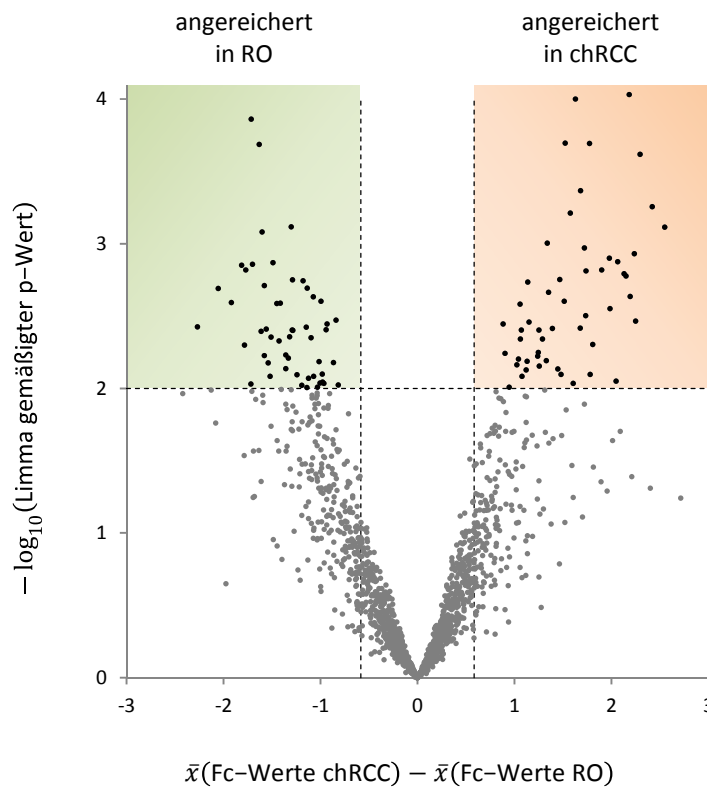


Abbildung IV-20. Volcano plot der negativen, dekadischen Logarithmen der mittels Limma errechneten gemäßigten p-Werte für die quantifizierten Proteingruppen gegen die Mittelwertsdifferenz der Fc-Werte zum Standard für den Vergleich zwischen chRCC und RO. (\bar{x} = arithmetischer Mittelwert)

Bei den in Tabelle IV-2 aufgeführten Proteingruppen sind außerdem die im SAM als signifikant unterschiedlich exprimiert ermittelten gekennzeichnet. Bei einem delta-Wert von 0,967 waren dies elf Proteine mit einer medianen FDR von 0 %. Durch Verringerung des delta-Wertes auf 0,833 ergaben sich zusätzlich 49 Proteingruppen. Dies war der kleinstmögliche delta-Wert, bei dem die mediane FDR nicht über 5 % lag.

Ergänzend zu den statistischen Angaben sind in Tabelle IV-2 die dekadisch logarithmierten iBAQ-Werte, die Anzahl der quantifizierten Peptide, die für das jeweilige Protein spezifisch sind und der von diesen abgedeckte prozentuale Anteil an der gesamten Proteinsequenz zu finden. Bei Unterschieden in diesen Werten zwischen den Proben ist jeweils der minimale und maximale Wert angegeben.

Tabelle IV-2. Proteingruppen mit signifikant unterschiedlicher Proteinexpression zwischen chRCC und RO. Der gemäßigte p-Wert wurde mittels Limma berechnet. Zusätzlich im SAM mit einer medianen FDR von 0 % bzw. kleiner 5 % als signifikant unterschiedlich ermittelte Proteingruppen sind durch ** bzw. * nach dem Proteinnamen gekennzeichnet.

<i>Proteinname</i>	<i>Gencode</i>	<i>UniProt ID</i>	<i>Mittelwertsdifferenz Fc-Werte</i>	<i>gemäßigter p-Wert</i>	<i>Anzahl spezifischer Peptide</i>	<i>Sequenzabdeckung [%]</i>	<i>log₁₀ (iBAQ-Wert)</i>
Phosphoglucomutase-like protein 5**	PGM5	Q15124	2,55	0,001	1 - 8	2 - 19	5 - 7
Tissue alpha-L-fucosidase**	FUCA1	P04066	2,42	0,001	1 - 6	2 - 17	7 - 8
Beta-mannosidase**	MANBA	O00462	2,30	0,000	1 - 12	2 - 15	6 - 7
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2*	LAMP2	P13473	2,25	0,003	2 - 3	4 - 7	8 - 9
Histone H1.5*	HIST1H1B	P16401	2,24	0,001	2 - 3	10 - 17	7 - 9
Epididymis-specific alpha-mannosidase*	MAN2B2	Q9Y2E5	2,19	0,002	2 - 5	1 - 6	6 - 7
N-acetylglucosamine-6-sulfatase**	GNS	P15586	2,18	0,000	7 - 9	14 - 18	8
Interleukin-18*	IL18	Q14116	2,15	0,002	1 - 4	4 - 18	7 - 8
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase*	PRCP	P42785	2,13	0,002	3 - 6	7 - 13	7 - 8
Glycogen debranching enzyme*	AGL	P35573	2,07	0,001	2 - 13	2 - 11	5 - 7
Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	HSD11B2	P80365	2,05	0,009	4 - 8	9 - 32	8 - 9
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1*	LAMP1	P11279	1,99	0,003	2 - 6	5 - 14	8 - 9
Ras-related protein Rab-9A/B*	RAB9A/B	P51151; Q9NP90	1,98	0,001	1 - 3	7 - 20	6 - 8
Putative phospholipase B-like 2*	PLBD2	Q8NHP8	1,90	0,002	4 - 5	8 - 9	7
Small VCP/p97-interacting protein*	SVIP	Q8NHG7	1,81	0,005	1 - 2	14 - 33	7 - 8
Protein NDRG1	NDRG1	Q92597	1,78	0,008	4 - 7	16 - 30	7 - 9
F-box only protein 2**	FBXO2	Q9UK22	1,77	0,000	2 - 4	12 - 20	7 - 8
ADP-ribosylation factor-like protein 8A*	ARL8A	Q96BM9	1,74	0,002	1 - 3	5 - 18	7 - 9
N-sulphoglucosamine sulphohydrolase*	SGSH	P51688	1,74	0,003	1 - 6	2 - 16	6 - 7
Ras-related protein Rap-2b/a/c*	RAP2B/A/C	⁶	1,72	0,001	2 - 4	12 - 27	8
Sorbitol dehydrogenase**	SORD	Q00796	1,68	0,000	2 - 4	9 - 14	6 - 8
Dipeptidyl peptidase 1*	CTSC	P53634	1,68	0,004	1 - 5	3 - 18	7 - 8
Heme-binding protein 1**	HEBP1	Q9NRV9	1,63	0,000	3 - 6	19 - 43	8
Syntaxin-binding protein 2	STXBP2	Q15833	1,61	0,009	2 - 5	5 - 12	6 - 7
Osteoclast-stimulating factor 1**	OSTF1	Q92882	1,58	0,001	3 - 4	13 - 24	7 - 8
Methyltransferase-like protein 7A**	METTL7A	Q9H8H3	1,52	0,000	3 - 6	17 - 31	8 - 9
Sialate O-acetyltransferase*	SIAE	Q9HAT2	1,52	0,002	4 - 8	9 - 18	7 - 8
Cytochrome b5	CYB5A	P00167	1,48	0,008	3 - 4	32 - 41	8 - 9

⁶ P61225; Q9Y3L5; P10114

Proteinname	Genname	UniProt ID	Mittelwertsdifferenz Fc-Werte	gemäßiger p-Wert	Anzahl spezifischer Peptide	Sequenzabdeckung [%]	log ₁₀ (iBAQ-Wert)
V-type proton ATPase subunit d 1*	ATP6V0D1	P61421	1,47	0,002	1 - 6	4 - 22	7 - 8
V-type proton ATPase subunit d 2	ATP6V0D2	Q8N8Y2	1,45	0,007	1 - 9	3 - 30	7 - 9
Aldose 1-epimerase*	GALM	Q96C23	1,39	0,004	2 - 6	9 - 25	7 - 8
Retinol dehydrogenase 11*	RDH11	Q8TC12	1,35	0,002	1 - 7	4 - 31	7 - 8
Ras-related protein Rab-21**	RAB21	Q9UL25	1,34	0,001	3 - 7	17 - 41	7 - 8
Lysosome membrane protein 2	SCARB2	Q14108	1,33	0,006	3 - 6	7 - 12	7 - 8
Glycogen phosphorylase, brain/muscle/liver form*	PYGB/M/L	7	1,29	0,005	15 - 26	22 - 38	8 - 9
Creatine kinase U-type, mitochondrial	CKMT1A	P12532	1,26	0,007	3 - 7	10 - 25	8 - 9
Annexin A2; Putative annexin A2-like protein*	ANXA2; ANXA2P2	P07355; A6NMY6	1,25	0,004	14 - 17	48 - 55	8 - 9
Ras-related protein Rab-7a*	RAB7A	P51149	1,25	0,006	7 - 11	39 - 62	8 - 9
Rho GTPase-activating protein 6*	ARH-GAP6	O43182	1,24	0,006	1 - 5	1 - 8	5 - 6
Ras-related protein Rab-14*	RAB14	P61106	1,15	0,003	5 - 8	28 - 47	8 - 9
Protein phosphatase 1A/B	PPM1A/B	P35813; O75688	1,14	0,002	2 - 8	6 - 28	6 - 8
Synaptobrevin homolog YKT6*	YKT6	O15498	1,13	0,006	1 - 4	5 - 25	6 - 7
Ras-related protein Rab-1B/1A/8A/8B/13/15 ⁸	RAB1B/1A ⁹	10	1,12	0,007	1 - 4	9 - 24	6 - 9
Glycolipid transfer protein	GLTP	Q9NZD2	1,08	0,008	2 - 5	11 - 23	7 - 8
Ras-related protein Rap-1b; Ras-related protein Rap-1b-like protein*	RAP1B	P61224; A6NIZ1	1,07	0,004	1 - 2	7 - 14	7 - 9
Fructose-bisphosphate aldolase C*	ALDOC	P09972	1,06	0,005	1 - 6	6 - 23	7 - 8
Twinfilin-1*	TWF1	Q12792	1,06	0,003	3 - 8	10 - 27	6 - 8
Ras-related protein Rab-2A/B*	RAB2A/B	P61019; Q8WUD1	1,04	0,006	2 - 8	14 - 48	8 - 9
Ras-related protein Rab-11B/A	RAB11B/A	Q15907; P62491	1,02	0,007	8 - 10	36 - 53	8 - 9
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	PSMD9	O00233	0,95	0,010	1 - 4	4 - 22	7 - 8
Fructose-bisphosphate aldolase A/B*	ALDOA/B	P04075; P05062	0,90	0,006	7 - 10	29 - 42	8 - 9
Acetolactate synthase-like protein**	ILVBL	A1L0T0	0,88	0,004	1 - 5	3 - 15	5 - 7
Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4	Q9HC38	-0,82	0,009	5 - 9	18 - 33	7 - 8
14-3-3 protein theta*	YWHAQ	P27348	-0,84	0,003	3 - 6	15 - 35	8
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	BCKDHB	P21953	-0,87	0,007	2 - 5	6 - 16	7 - 8
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha ¹¹ *	PDHA1/2	P08559; P29803	-0,93	0,004	7 - 15	17 - 43	8 - 9

⁷ P11216; P11217; P06737

⁸ und Putative Ras-related protein Rab-1C

⁹ und RAB8A/8B/13/15/1C

¹⁰ Q9H0U4; Q92928; P62820; P51153; Q92930; P59190; P61006

¹¹ somatic/testis-specific form, mitochondrial

<i>Proteinname</i>	<i>Genname</i>	<i>UniProt ID</i>	<i>Mittelwertsdifferenz Fc-Werte</i>	<i>gemäßigter p-Wert</i>	<i>Anzahl spezifischer Peptide</i>	<i>Sequenzabdeckung [%]</i>	<i>log₁₀ (iBAQ-Wert)</i>
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial*	PDHB	P11177	-0,94	0,004	10 - 11	34 - 42	8 - 9
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	MRPL4	Q9BYD3	-0,97	0,009	2 - 3	11 - 15	7
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX4I1	P13073	-0,98	0,009	3 - 7	21 - 43	8 - 9
ATP synthase protein 8	MT-ATP8	P03928	-0,98	0,008	1 - 2	16 - 35	8 - 9
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial*	CLPP	Q16740	-0,99	0,002	1 - 6	5 - 27	6 - 8
Ovarian cancer-associated gene 2 protein	OVCA2	Q8WZ82	-1,01	0,009	1 - 3	6 - 22	7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 5	NDUFAF5	Q5TEU4	-1,01	0,007	1 - 4	4 - 12	6 - 7
Bis(5-adenosyl)-triphosphatase*	FHIT	P49789	-1,03	0,010	1 - 3	9 - 31	7 - 8
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ACOT9	Q9Y305	-1,07	0,008	3 - 12	7 - 34	6 - 8
GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial*	AK3	Q9UIJ7	-1,07	0,002	6 - 9	30 - 44	8 - 9
Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A/B	FAHD2A/B	Q96GK7; Q6P2I3	-1,10	0,004	1 - 6	5 - 26	7 - 8
Mitochondrial chaperone BCS1	BCS1L	Q9Y276	-1,13	0,008	1 - 11	2 - 35	7 - 8
39S ribosomal protein L1, mitochondrial*	MRPL1	Q9BYD6	-1,14	0,002	3 - 6	10 - 24	7 - 8
NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial	NFU1	Q9UMS0	-1,14	0,010	2 - 4	10 - 20	7 - 8
39S ribosomal protein L19, mitochondrial	MRPL19	P49406	-1,15	0,004	2 - 3	6 - 12	7
Moesin*	MSN	P26038	-1,18	0,002	4 - 11	6 - 24	7 - 8
Growth factor receptor-bound protein 14	GRB14	Q14449	-1,19	0,009	2 - 4	4 - 11	7 - 8
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	UQCRB	P14927	-1,24	0,008	4 - 5	37 - 45	9 - 10
Protein NipSnap homolog 3A/B	NIPS-NAP3A/B	Q9UFN0; Q9BS92	-1,29	0,004	1 - 6	6 - 32	7 - 8
Palmitoyl-protein thioesterase 1*	PPT1	P50897	-1,29	0,002	2 - 4	9 - 23	7 - 8
Citrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial	CLYBL	Q8N0X4	-1,29	0,004	4 - 10	18 - 40	7 - 9
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial*	BCAT2	O15382	-1,30	0,001	3 - 9	8 - 28	7 - 8
Cysteine desulfurase, mitochondrial	NFS1	Q9Y697	-1,32	0,004	3 - 10	8 - 33	7 - 8
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2*	ATPAF2	Q8N5M1	-1,33	0,006	1 - 5	3 - 22	7 - 8
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLA2	Q9P2R7	-1,36	0,006	7 - 12	15 - 35	8 - 9
ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	O75947	-1,36	0,007	5 - 7	34 - 58	8 - 9
28S ribosomal protein S23, mitochondrial*	MRPS23	Q9Y3D9	-1,42	0,003	2 - 5	12 - 27	7 - 8
ATP synthase subunit a	MT-ATP6	P00846	-1,43	0,005	1	4	7 - 9
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial*	COX5A	P20674	-1,45	0,003	3	21	9 - 10
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial*	PRDX3	P30048	-1,49	0,001	4 - 6	18 - 31	9 - 10
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	P10606	-1,51	0,004	5	45	9 - 10

Proteinname	Genname	UniProt ID	Mittelwertsdifferenz Fc-Werte	gemäßiger p-Wert	Anzahl spezifischer Peptide	Sequenzabdeckung [%]	log ₁₀ (iBAQ-Wert)
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	P10809	-1,52	0,008	16 - 20	35 - 47	8 - 9
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	Q9BTT0	-1,54	0,007	1	5	6 - 8
Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	MUT	P22033	-1,56	0,004	3 - 10	6 - 18	6 - 8
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial*	PCK2	Q16822	-1,58	0,006	1 - 8	2 - 16	6 - 7
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial*	HADHB	P55084	-1,58	0,002	10 - 17	23 - 47	8 - 9
Aspartate-tRNA ligase, mitochondrial*	DARS2	Q6PI48	-1,60	0,001	4 - 13	6 - 23	7 - 8
ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial	ABCB8	Q9NUT2	-1,61	0,004	3 - 8	4 - 15	7
39S ribosomal protein L44, mitochondrial*	MRPL44	Q9H9J2	-1,63	0,000	2 - 7	5 - 25	6 - 8
39S ribosomal protein L53, mitochondrial	MRPL53	Q96EL3	-1,70	0,001	2 - 3	21 - 36	7 - 8
Integrin alpha-V*	ITGAV	P06756	-1,71	0,000	2 - 11	2 - 13	6 - 7
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	P40939	-1,72	0,009	16 - 24	27 - 43	8 - 9
Methylmalonyl-CoA epimerase, mitochondrial	MCEE	Q96PE7	-1,77	0,002	1 - 3	6 - 18	7 - 8
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	O14773	-1,78	0,005	3 - 4	8 - 11	8 - 9
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial*	ACADS	P16219	-1,81	0,001	10 - 16	31 - 54	8 - 9
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	MRPL12	P52815	-1,92	0,003	1 - 2	5 - 11	7 - 9
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	PNPT1	Q8TCS8	-2,06	0,002	2 - 14	2 - 22	6 - 8
Ferritin light chain	FTL	P02792	-2,27	0,004	3 - 5	21 - 39	8 - 10

2.1.4 Angereicherte, biologische Motive

Im Anschluss an die Prüfung der 1 635 Proteingruppen auf zwischen den RO und chRCC signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine, folgte für beide Neoplasien eine funktionelle Analyse der jeweils 52 mittels Limma ermittelten Proteingruppen. Hierzu wurden alle in die statistischen Tests mit einbezogenen Proteingruppen in DAVID als Hintergrund definiert. Die in Abbildung IV-21 dargestellte Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analysen erfolgte danach äquivalent zu der für Abbildung IV-4 in Kapitel IV.1.1.4 geschilderten Weise.

In Abbildung IV-21 sind alle für die chRCC aufgeführten biologischen Motive zum 5 %-Niveau signifikant angereichert. Die DAVID-Scores von 3,91 und 5,48 für die ersten beiden Annotationsgruppen lassen auf eine Überrepräsentierung von Proteinen aus den beiden zellulär miteinander in Beziehung stehenden Zellkompartimenten Lysosom und Endosom schließen. Auch unter Berücksichtigung der gleichzeitigen Testung mehrerer Hypothesen durch die Benjamini-Korrektur bleibt der p-Wert für eine Anreicherung dieser beiden Annotationen unter 0,05. Dies trifft auch auf die meisten der in der dritten Gruppe von DAVID zusammengefassten Motive zu. Bei diesen handelt es sich um Annotationen, die verschiedene Aspekte rund um Ras GTPasen beinhalten. So führt deren posttranslationale Prenylierung ebenso wie ihre Beteiligung an der Signaltransduktion zu einer signifikanten Anreicherung dieser Motive. Unter den im Vergleich zum RO im chRCC signifikant mehr exprimierten Ras GTPasen sind insbesondere diejeni-

gen vom Rab-Typ vermehrt vertreten. Entsprechend deren Funktion in der Regulierung des Membrantransports ergab die funktionelle Analyse nicht nur die bereits genannte allgemeine Anreicherung von lysosomalen und endosomalen Proteinen, sondern auch von Proteinen, die mit der Innenseite der Plasmamembran, dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat oder Membranen insgesamt assoziiert werden. Eine Anreicherung von Proteinen, die Kohlenhydrate allgemein und speziell im Rahmen des Hexose-Metabolismus und des Polysaccharid-Katabolismus binden, unter den im Vergleich zum RO beim chRCC vermehrt exprimierten Proteinen ist nach Benjamini-Korrektur hingegen nicht mehr signifikant.

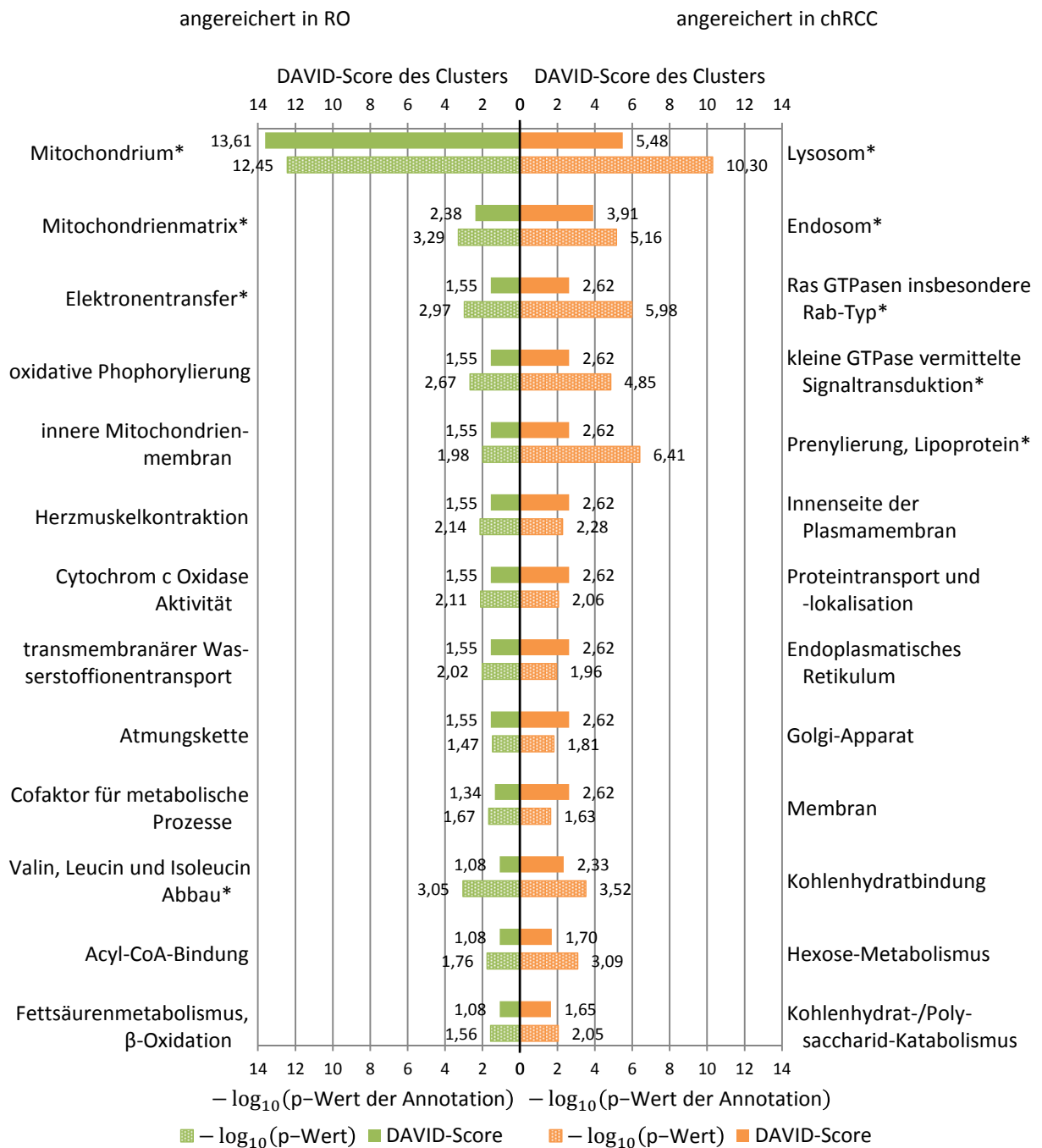


Abbildung IV-21. Im Vergleich zwischen chromophobem Nierenzellkarzinom und renalem Onkozytom angereicherte biologische Motive. Die einzelnen Annotationen sind anhand des durch DAVID für den jeweiligen Cluster berechneten Scores sortiert. Zusätzlich ist für jede Annotation die Wahrscheinlichkeit dafür, dass keine Anreicherung vorliegt, in Form des negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes angegeben. Die Annotationsbezeichnungen sind mit einem * markiert, wenn der p-Wert nach Benjamini-Korrektur unter 0,05 lag.

Alle bei den RO in Abbildung IV-21 genannten Motive sind in Bezug auf einen Grenzwert für p von 0,05 signifikant angereichert und stehen fast alle in einem Zusammenhang mit den Mitochondrien. Dies liegt daran, dass 40 der 52 im Vergleich zum chRCC beim RO signifikant mehr exprimierten Proteine mitochondrial sind. So umfasst die erste durch DAVID zusammengefasste Gruppe von Annotationen ganz allgemein das Mitochondrium. Diese Gruppe erreicht einen sehr hohen DAVID-Score von 13,61 und der sehr niedrige p -Wert für eine fehlerhafte Annahme einer Anreicherung bleibt auch nach Benjamini-Korrektur sehr klein. Die weiteren Annotationen stellen im Allgemeinen Konkretisierungen zu diesem Zellorganell da. So umfassen diese sowohl die Mitochondrienmatrix als auch die an der inneren Mitochondrienmembran ablaufenden Prozesse, wie den transmembranären Wasserstoffionentransport, den Elektronentransfer und die Cytochrom c Oxidase Aktivität im Rahmen der Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung. Letztere sind nach Benjamini-Korrektur allerdings nicht mehr zum 5 %-Niveau signifikant angereichert. Im Gegensatz dazu ist dies für die Anreicherung von Proteinen, die dem Abbau von Valin, Leucin und Isoleucin zuzurechnen sind, der Fall.

2.2 Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1

Nach der Ermittlung zwischen chRCC und RO signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine und darunter angereicherter biologischer Motive im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse schloss sich die Untersuchung der Expression einiger ausgewählter Proteine in der IHC an. Die funktionelle Analyse der bei den chRCC mehr exprimierten Proteine ergab eine deutliche Anreicherung lysosomaler Proteine. Daher bot es sich an, das sowohl im Limma als auch im SAM signifikant von den chRCC mehr exprimierte Lysosom-assoziierte Membranprotein 1 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 1, LAMP1) immunhistochemisch zu färben. Der Unterschied zwischen den mittleren Fc-Werten betrug 1,99.

Ausschnitte aus den Färbungen für die je sechs miteinander verglichenen chRCC und RO sind zusammen mit den Ergebnissen aus der massenspektrometrischen Analyse für diese in Abbildung IV-22 abgebildet.

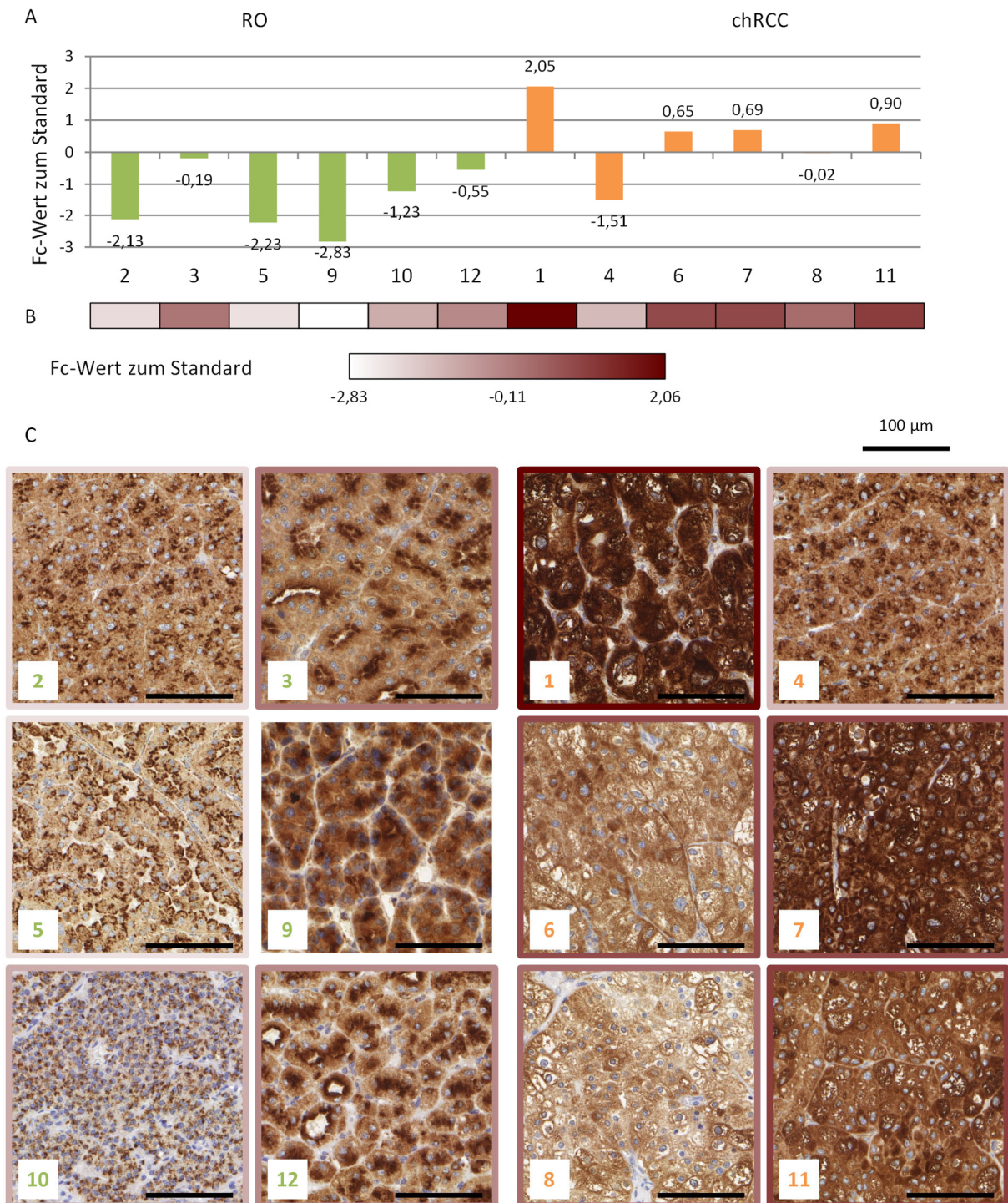


Abbildung IV-22. Expression des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1 bei chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für die 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Entität sortiert (RO links, chRCC rechts). Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

2.2.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

In der IHC zeigten sowohl die Tumorzellen der chRCC als auch der RO eine deutliche cytoplasmatische Expression von LAMP1. Die Zellen im Tumorstroma waren hingegen meist negativ oder präsentierten lediglich eine schwache bis mäßige, feingranuläre Positivität. Außerdem

wurde bei der qualitativen Beurteilung ein unterschiedliches Färbemuster hinsichtlich der Verteilung der Intensitäten innerhalb des Zytoplasmas einer Zelle bemerkt. Wie aus Abbildung IV-23 ersichtlich wird, wies das Zytoplasma bei einigen der Tumoren für die meisten Zellen innerhalb einer jeden Zelle eine einheitliche Färbeintensität auf, während die meisten Zellen der anderen Tumoren verschiedene Intensitäten innerhalb einer Zelle zeigten. Diese heterogen gefärbten Zellen waren überwiegend mäßig gefärbt mit einem fokalen oder mehreren multifokalen, stark gefärbten Anteilen. Bei tubulärem und zystischem Wachstum befanden sich diese Anteile in der Mehrheit der Fälle apikal. Ein ähnliches Färbemuster konnte bei den zehn der zwölf Schnitte, bei denen normales Nierengewebe mit eingebettet wurde, bei den Epithelzellen der Nierentubuli festgestellt werden. Auch diese zeigten punktuell stärker gefärbte Anteile bei insgesamt schwach bis mäßig gefärbtem Zytoplasma. Eine apikale Lokalisation dieser Anteile ergab sich hierbei teilweise bei den distalen Tubuli und häufig in den Sammelrohren. In den proximalen Tubuli waren diese dunkleren Anteile überwiegend diffus verteilt.

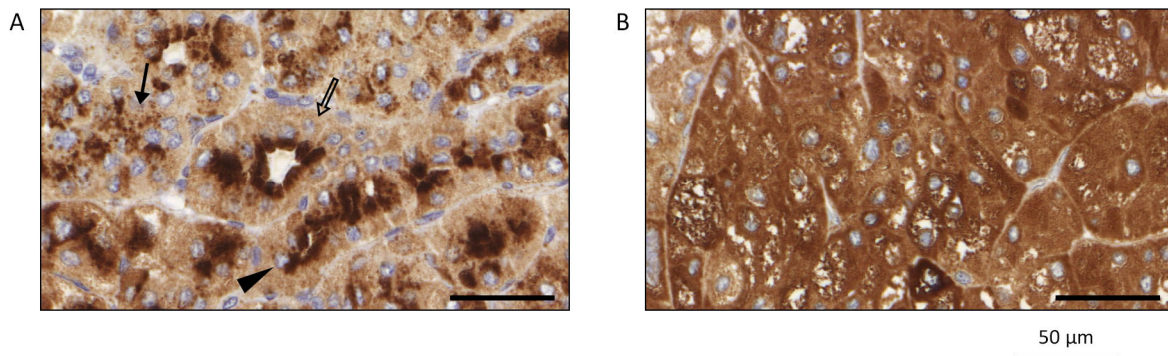


Abbildung IV-23. Unterschiedliche Reaktionsmuster des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1 in der IHC. A: Renales Onkozytom mit heterogen gefärbten Tumorzellen. Die stärker gefärbten Anteile treten bei einzelnen Zellen fokal (Pfeilspitze), bei tubulärem Wachstum apikal (unausgefüllter Pfeil) oder multifokal (ausgefüllter Pfeil) auf. B: Chromophobes Nierenzellkarzinom bei dem das Zytoplasma verschiedener Zellen zum Teil unterschiedlich intensiv gefärbt ist, innerhalb einer Zelle weist es jedoch eine weitestgehend homogene Färbung auf. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 50 µm.)

2.2.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

Auf die qualitative Beurteilung folgte die semiquantitative Evaluation der mittels Antikörper gegen LAMP1 immunhistochemisch gefärbten Schnitte. Um hierbei den bei der qualitativen Beurteilung bereits beschriebenen Unterschied bezüglich des Verteilungsmusters der Intensitäten innerhalb einer Zelle zu berücksichtigen, fand eine Erweiterung des in Kapitel III.7.2 erläuterten Verfahrens statt. Zunächst erfolgte, wie dort geschildert, die Einteilung der Gesamtfläche in die vier Färbeintensitäten. Im Falle der Zellen mit verschiedenen Intensitäten innerhalb einer Zelle war hierbei die dominierende und somit meist die hellere Färbeintensität entscheidend, während die kleineren anders gefärbten Anteile unberücksichtigt blieben. Zur Erfassung dieser wurde anschließend für jeden Fall zusätzlich der prozentuale Anteil der Zellen, die gleichzeitig unterschiedliche Färbeintensitäten aufwiesen, an der Gesamtumorzellzahl geschätzt.

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind für die je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten RO und chRCC in Abbildung IV-24 und Teil A der Abbildung IV-25 abgebildet. Während bei den chRCC im Mittel 11,7 % der Gesamtfläche eine starke Färbung präsentierte, lag der Flächenanteil der Zellen, bei denen eine starke Färbung dominierte bei den RO bei 0 %. Mit einem Mittelwert der chRCC von 25,0 % im Vergleich zu 3,3 % bei den RO war der Flächenanteil mit

einer mäßigen Färbung bei den chRCC signifikant größer als bei den RO. Korrespondierend zu dem größeren Anteil bei den Intensitäten 2 und 3 für die chRCC zeigten die RO im Mittel größere Flächenanteile bei den Intensitäten 0 und 1. Mit 88,3 % zu 58,3 % war dieser Unterschied für die Färbintensität 1 signifikant. Zusammenfassend ließ sich anhand der Verteilung der Gesamtfläche auf die vier Färbintensitäten in der semiquantitativen Evaluation eine signifikant stärkere Expression von LAMP1 durch die chRCC im Vergleich zu den RO feststellen.

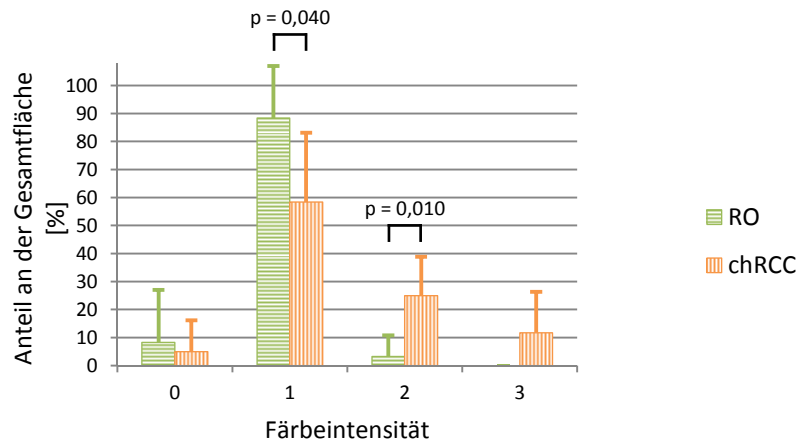


Abbildung IV-24. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 bei den je sechs renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen, die mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbintensitäten aufgetragen. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test)

Die nachfolgende Abschätzung des prozentualen Anteils an heterogen gefärbten Zellen ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den RO und chRCC. Dieser war mit 78,3 % bei den RO deutlich größer als die 23,3 % bei den chRCC. (siehe Teil A der Abbildung IV-25)

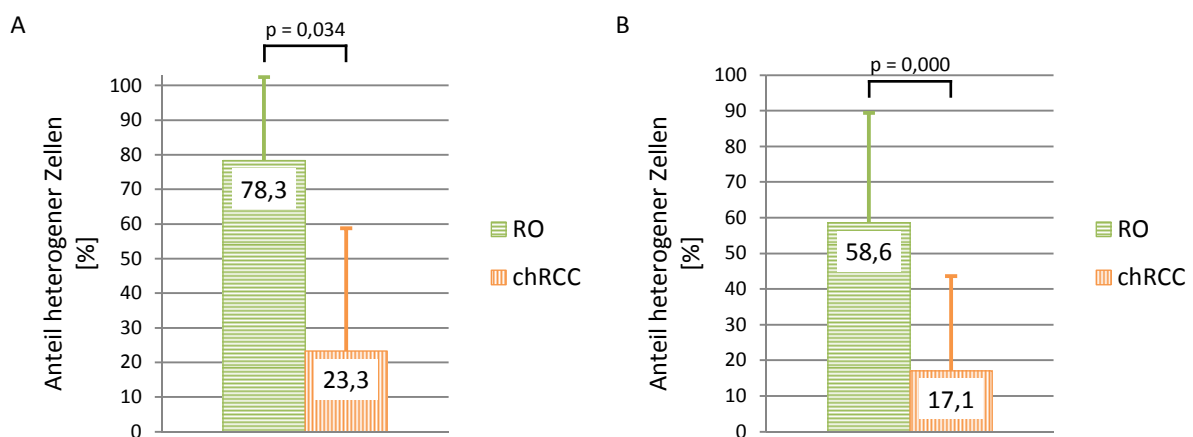


Abbildung IV-25. Prozentualer Anteil an Zellen, die bei der Färbung von LAMP1 innerhalb der Zelle unterschiedliche Färbintensitäten zeigten. Mittelwerte mit den Standardabweichungen A: für die je sechs renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome, die mittels Massenspektrometrie analysiert wurden und B: der zusätzlich gefärbten 42 renalen Onkozytome bzw. 31 chromophoben Nierenzellkarzinome. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test)

Zur Überprüfung der bereits bei dem kleinen, massenspektrometrisch untersuchten Kollektiv signifikanten Unterschiede zwischen chRCC und RO folgte darüber hinaus eine Untersuchung weiterer chRCC und RO mittels IHC. In Teil B der Abbildung IV-25 und in Abbildung IV-26 sind die Ergebnisse der semiquantitativen Evaluation für diese 42 RO und 31 chRCC zu finden. Insgesamt bestätigen diese die bereits für die initial untersuchten Fälle beschriebenen Ergebnisse. Die Unterschiede waren aufgrund der größeren Fallzahl hierbei sogar hoch signifikant.

Im Detail lag der Anteil heterogener Zellen auch bei den zusätzlich gefärbten Fällen mit im Mittel 58,6 % bei den RO über den 17,1 % bei den chRCC. Die Mittelwerte der Flächenanteile betrugen bei den RO 75,5 %, 17,4 % und 0,2 % für die Intensitäten 1, 2 und 3 bzw. 54,5 %, 30,2 % und 14,4 % bei den chRCC. Somit resultierte aus der Auswertung der zusätzlichen Fälle ein hoch signifikanter Unterschied zwischen chRCC und RO für diese drei Färbintensitäten mit einem höheren Flächenanteil mit mäßiger und starker Färbung und einem dem entsprechenden niedrigeren Anteil mit schwacher Färbung bei den chRCC im Vergleich zu den RO.

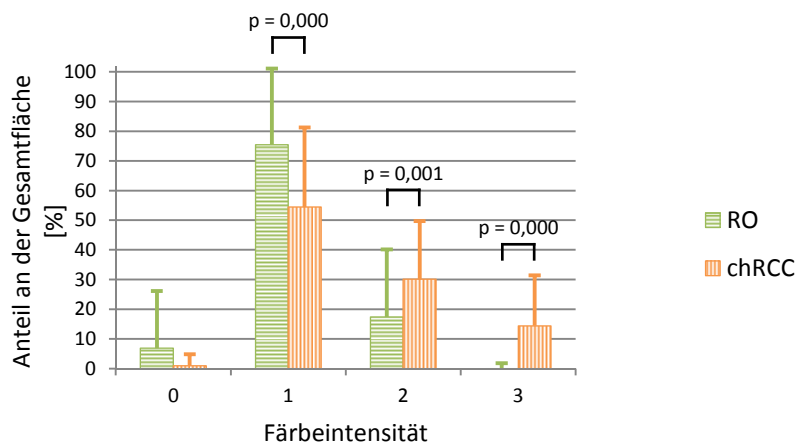


Abbildung IV-26. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 bei 42 renalen Onkozytomen und 31 chromophoben Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbintensitäten aufgetragen. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test)

2.2.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Im Gegensatz zur semiquantitativen Evaluation ist eine Berücksichtigung unterschiedlicher Färbemuster bei der Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ nicht möglich. Hingegen bezieht diese bei unterschiedlichen Färbintensitäten innerhalb einer Zelle auch die kleineren, anders gefärbten Anteile exakt mit ein, deren Flächenanteil bei der semiquantitativen Evaluation schwieriger einzuschätzen wäre. Somit ergänzen sich die beiden verwendeten Auswertungsmethoden bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 sehr gut.

Auch unter Einschluss der kleineren, meist dunkler gefärbten Areale, die laut semiquantitativer Evaluation bei den RO öfter auftraten als bei den chRCC, waren sehr dunkle Pixel bei den chRCC häufiger als bei den RO. Dies wird anhand des in Teil A der Abbildung IV-27 dargestellten Histogramms deutlich. Dieser Unterschied beeinflusste auch die aus den relativen Häufigkeiten der Pixelintensitäten 254 bis 0 für jeden Fall berechneten Bewertungszahlen. Deren Mittelwert war mit 89,97 bei den chRCC kleiner als die 115,58 bei den RO (siehe Teil B der Abbildung IV-27). Eine kleinere Bewertungszahl spricht für eine dunklere Färbung der chRCC. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Des Weiteren spiegelt sich die genannte Diskrepanz bei

den relativen Häufigkeiten der Pixelintensitäten nach der Einteilung in die vier Färbegrade durch IHC Profiler in einem im Mittel größeren stark gefärbten Anteil bei den chRCC als bei den RO wider. Dieser lag für erstere bei 42,8 %, für letztere bei 21,1 %. Dieser Unterschied war, wie auch die der anderen Färbegrade in Teil C der Abbildung IV-27, ebenfalls nicht signifikant. Bei den anderen Färbegraden bestand der Unterschied zwischen RO und chRCC in einem größeren Mittelwert des prozentualen Anteils bei den RO. Im Detail betrugen die Mittelwerte 17,2 % bzw. 11,1 % bei dem Färbegrad 0, 25,9 % bzw. 16,7 % bei dem Färbegrad 1 und 35,8 % bzw. 29,3 % bei dem Färbegrad 3. Abschließend deuten die Ergebnisse der Auswertung mit IHC Profiler auf eine stärkere Expression von LAMP1 durch die chRCC im Vergleich zu den RO hin. In Bezug auf das nur sechs Fälle pro Entität umfassende, initial untersuchte Kollektiv war diese Tendenz allerdings nicht signifikant.

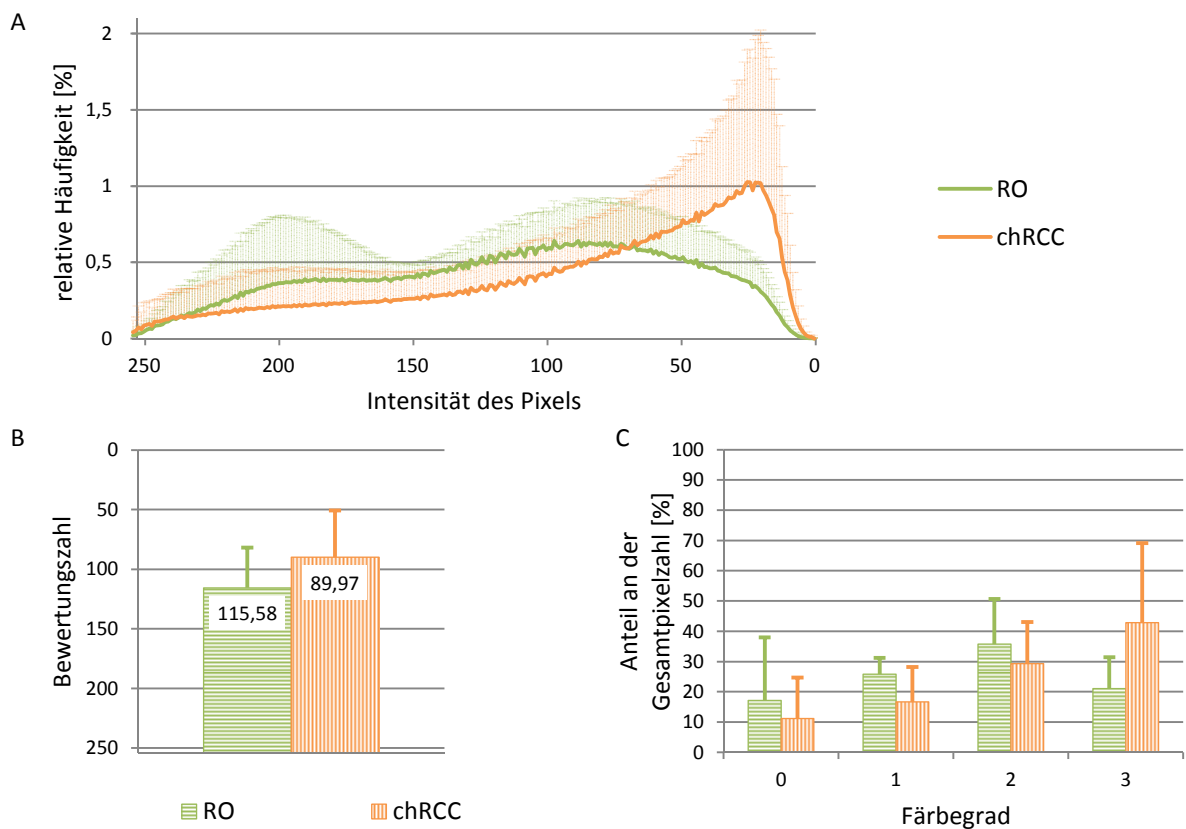


Abbildung IV-27. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 mit IHC Profiler für die je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen der sechs RO und sechs chRCC. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

Die Auswertung der mittels des Antikörpers gegen LAMP1 immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit IHC Profiler umfasste ferner die zusätzlich gefärbten 42 RO und 31 chRCC. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung IV-28 dargestellt. Äquivalent zur semiquantitativen Evaluation verifizierte das größere Kollektiv auch bei der Auswertung mit IHC Profiler die am kleinen, initial gefärbten Kollektiv festgestellten Unterschiede mit höheren Signifikanzen.

Hierbei sind sich die in den Teilen A der Abbildung IV-27 und der Abbildung IV-28 für die beiden Kollektive abgebildeten Histogramme bis auf eine geringere Standardabweichung bei

den 42 zusätzlich gefärbten RO sehr ähnlich. Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Bewertungszahlen der RO und chRCC in Teil B der Abbildung IV-28 ist mit 12,85 bei dem größeren Kollektiv zwar geringer als die Differenz selbiger von 25,61 (Teil B der Abbildung IV-27) bei dem kleineren Kollektiv, im Gegensatz zu diesem ist der Unterschied für die zusätzlich gefärbten Fälle jedoch signifikant. Die in Teil C der Abbildung IV-28 abgebildete Einteilung durch IHC Profiler in die vier Färbegrade zeigte keinen Unterschied zwischen den 42 RO und 31 chRCC bei dem Färbegrad 0. Die Mittelwerte der prozentualen Anteile der übrigen drei Färbegrade ähnelten mit 23,5 % für die RO bzw. 17,8 % für die chRCC bei dem Färbegrad 1, 37,8 % bzw. 30,3 % bei dem Färbegrad 2 und 28,7 % bzw. 42,9 % bei dem Färbegrad 3 den für das initial gefärbte Kollektiv ermittelten Werten. Folglich waren auch hier die Anteile der schwach und mäßig gefärbten Pixel bei den chRCC zu Gunsten eines größeren Anteils stark gefärbter Pixel geringer als bei den RO, bei denen der Anteil stark gefärbter Pixel kleiner war. Im Falle des großen Kollektivs stellten sich diese Unterschiede als hoch signifikant heraus.

Zusammenfassend ergab die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 eine, bei ausreichender Fallzahl, signifikant höhere Expression von LAMP1 beim chRCC im Vergleich zum RO.

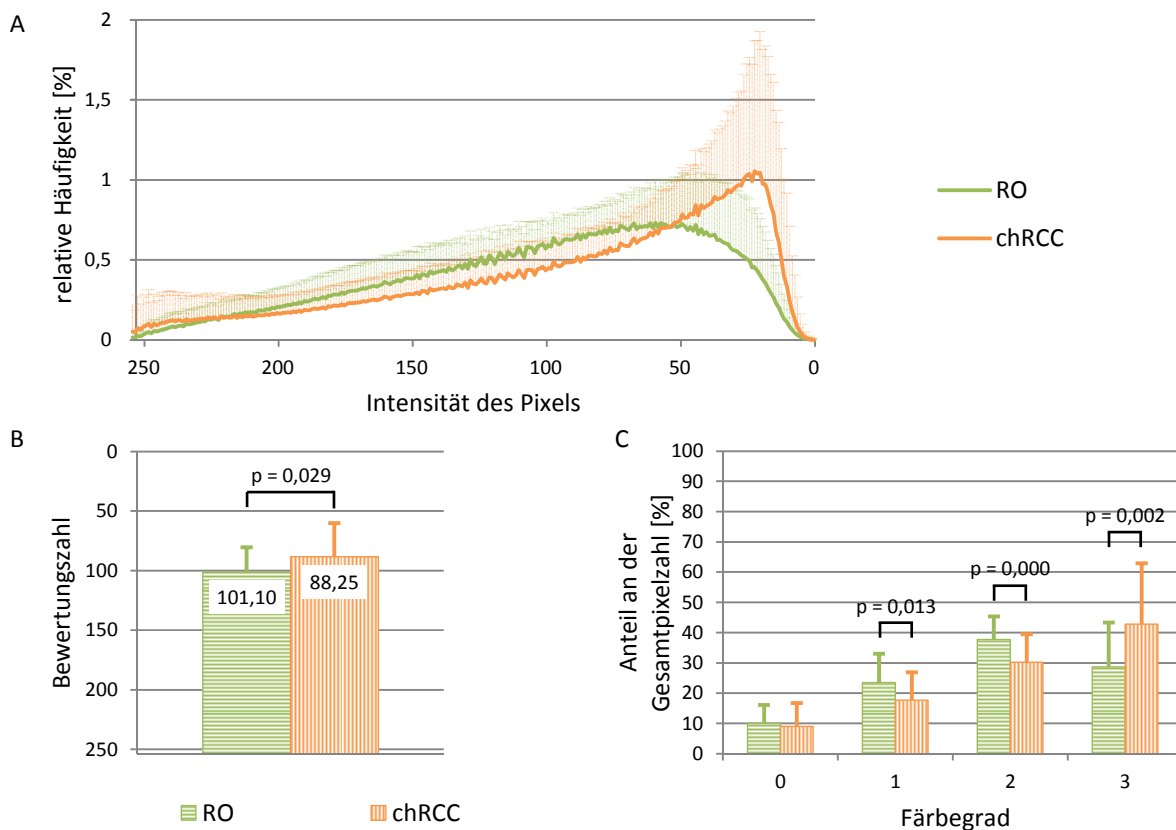


Abbildung IV-28. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von LAMP1 mit IHC Profiler für die zusätzlich gefärbten 42 renalen Onkozytome und 31 chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen der 42 RO und 31 chRCC. ($p =$ zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz) C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. ($p =$ zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz bei Färbegrad 1 und 2 bzw. mit unterschiedlicher Varianz bei Färbegrad 3)

2.2.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Im Anschluss an die Auswertung wurden die Ergebnisse der IHC von LAMP1 auf eine Korrelation mit den Ergebnissen für dieses Protein aus der Massenspektrometrie geprüft. Das Resultat dieses Tests ist für die semiquantitative Evaluation in Teil A und für die Auswertung mit IHC Profiler in Teil B der Abbildung IV-29 zu finden. Die Berechnung der Bewertungszahl nach Gleichung (5) (siehe Kapitel III.7.4) für einen Vergleich mit der semiquantitativen Evaluation basierte auf der in Kapitel IV.2.2.2 erläuterten Einteilung der Gesamtfläche für LAMP1. Somit fanden die kleineren, anders gefärbten Areale der heterogen gefärbten Zellen hierbei keine Berücksichtigung. Dennoch erwies sich eine signifikante, mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,63 starke Korrelation zwischen den Ergebnissen aus der semiquantitativen Evaluation und jenen aus der Massenspektrometrie. Obwohl die Bewertungszahlen bei der Auswertung mit IHC Profiler auch diese kleineren Anteile der heterogen gefärbten Zellen mit einbezogen, korrelierten diese nur schwach und nicht signifikant mit den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie. Diese Beobachtung entspricht der in den einzelnen Abschnitten beschriebenen Signifikanz des für die Expression von LAMP1 statuierten Unterschieds. Während alle drei Verfahren eine stärkere Expression von LAMP1 bei den chRCC im Vergleich zu den RO detektierten, war dieser Unterschied bei der massenspektrometrischen Analyse und der semiquantitativen Evaluation signifikant, bei der Auswertung des kleinen Kollektivs mit IHC Profiler allerdings nicht.

Darüber hinaus ist das Resultat eines Vergleichs zwischen den beiden zur Auswertung der IHC eingesetzten Methoden für die 12 initial untersuchten Fälle in Teil C der Abbildung IV-29 und für die 73 zusätzlich gefärbten Fälle in Abbildung IV-30 gezeigt. Trotz der beschriebenen ungleichen Berücksichtigung der verschiedenen Intensitäten der heterogenen Zellen korrelierten diese beiden Verfahren hoch signifikant miteinander. Für das kleine Kollektiv ließ sich hierbei mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,79 eine starke und für das große Kollektiv mit einem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho von 0,46 eine mittlere Korrelation nachweisen.

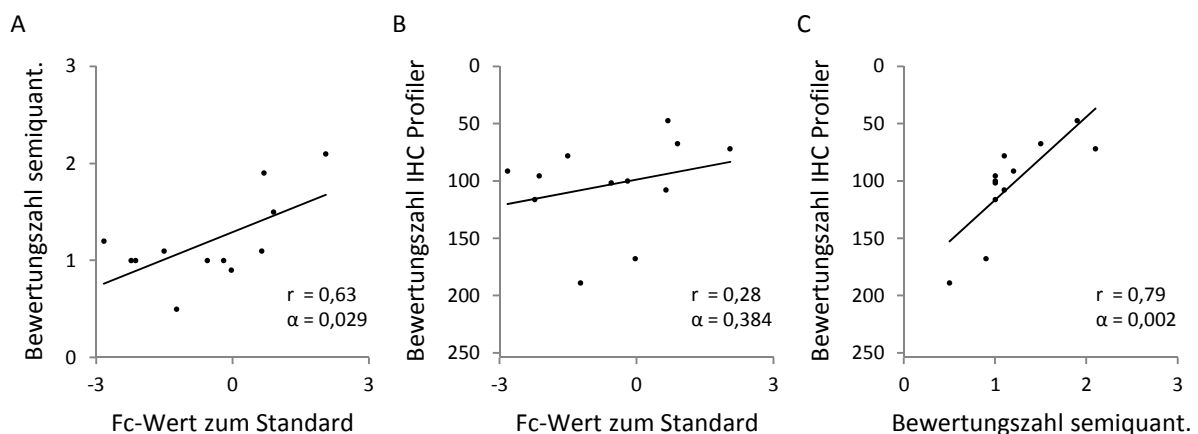


Abbildung IV-29. Pearson-Korrelationen der Ergebnisse zu LAMP1 bei den je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

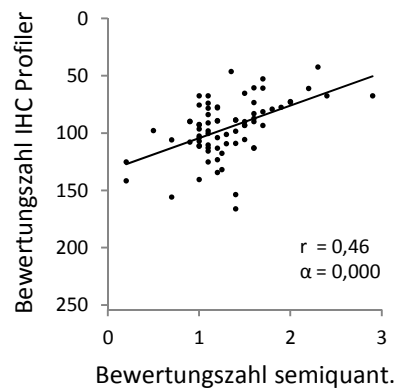


Abbildung IV-30. Korrelation zwischen den beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden bei den Färbungen von LAMP1 bei den 42 renalen Onkozytomen und 31 chromophoben Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. (r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

2.3 Sorbitol-Dehydrogenase

Neben dem LAMP1 als Repräsentant der lysosomalen Proteine erschien unter den bei den chRCC angereicherten Proteinen die Sorbitol-Dehydrogenase (SORD) als ein interessantes Ziel für eine weitere Abklärung mittels IHC. Die mit einer Differenz von 1,68 zwischen den mittleren Fc-Werten vermehrte Expression der SORD in den chRCC war sowohl im Limma als auch bei einer FDR von 0 % im SAM signifikant. Zudem wurde sie als nicht lysosomales Protein stellvertretend für die Gruppe der bei der funktionellen Analyse im Zusammenhang mit dem Hexose-Metabolismus stehenden Proteine ausgewählt.

Repräsentative Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen der SORD bei den chRCC und RO sind dem jeweiligen Ergebnis aus der massenspektrometrischen Analyse in Abbildung IV-31 gegenüber gestellt.

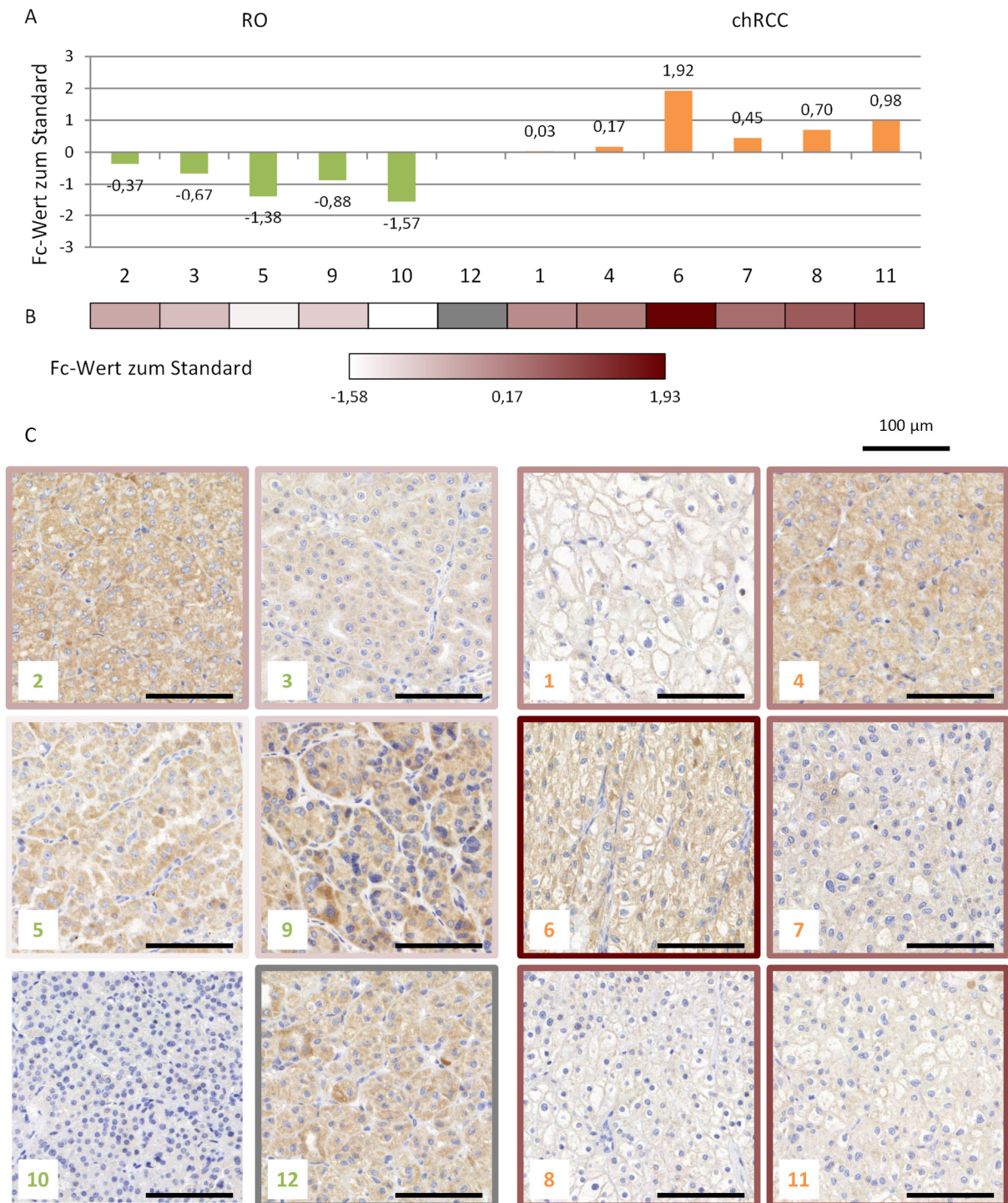


Abbildung IV-31. Expression der Sorbitol-Dehydrogenase bei chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für 11 der 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. Für Probe 12 konnte das Verhältnis durch MaxQuant nicht quantifiziert werden. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Entität sortiert (RO links, chRCC rechts). Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

2.3.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Eine schwache bis mäßige cytoplasmatische Expression von SORD durch die Tumorzellen konnte in den meisten Fällen mittels IHC bestätigt werden. In wenigen Fällen präsentierten sich einzelne Tumorzellen auch stark gefärbt. Das Tumorstroma war durchweg negativ. Im meist

vorhandenen, angrenzenden normalen Nierengewebe zeigten die Epithelzellen insbesondere der proximalen Nierentubuli eine starke immunhistochemische Färbung von SORD. Somit konnten diese als interne Kontrolle und als Unterstützung bei der semiquantitativen Evaluation genutzt werden.

2.3.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

Im Rahmen der qualitativen Beurteilung wurde die immunhistochemische Färbung von SORD für die Tumorzellen der RO und chRCC bereits als überwiegend schwach bis mäßig charakterisiert. Dies resultierte bei der semiquantitativen Evaluation darin, dass sich die Gesamtfläche im Mittel mit einem Anteil von 97,5 % bei den RO bzw. 99,2 % bei den chRCC nahezu ausschließlich auf die Intensitäten 0 und 1 verteilte. Die genaue Verteilung ist Abbildung IV-32 zu entnehmen. Hierbei lag der Mittelwert des prozentualen Flächenanteils bei Färbeintensität 1 mit 45,8 % für die RO über den 30,8 % der chRCC. Trotz des um den Faktor 1,5 größeren Mittelwerts der RO im Verhältnis zu den chRCC war dieser Unterschied bei der stärksten, nennenswert detektierten Färbeintensität nicht signifikant. Somit lässt sich in Bezug auf die semiquantitative Evaluation eine nicht signifikante Tendenz zu einer stärkeren Expression von SORD beim RO im Vergleich zum chRCC als Ergebnis der IHC resümieren.

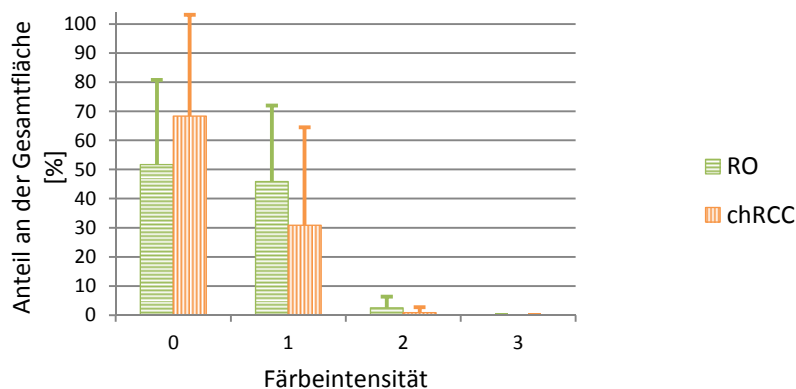


Abbildung IV-32. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von SORD bei den je sechs renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen.

2.3.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Die Ergebnisse der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von SORD mit IHC Profiler korrespondierten zu denen der semiquantitativen Evaluation. Mit zusammen im Mittel 97,0 % der Gesamtpixelzahl bei den RO bzw. 99,1 % bei den chRCC dominierten bei der Einteilung der Pixel in die vier Färbegrade durch IHC Profiler ebenfalls die Färbegrade 0 und 1 (siehe Teil C der Abbildung IV-33). Des Weiteren zeigte sich auch hier eine Tendenz zu einer stärkeren Expression von SORD beim RO im Vergleich zum chRCC. Dies wird zunächst an den Histogrammen in Teil A der Abbildung IV-33 ersichtlich. Hierbei weisen die RO im Bereich der dunkelsten detektierten Pixelintensitäten, bei den Intensitäten 200 bis 100, eine größere mittlere relative Häufigkeit auf, was sich auch auf die in Teil B der Abbildung IV-33 dargestellten Mittelwerte der Bewertungszahlen auswirkte. Mit 199,78 ist der Mittelwert der Bewertungszahlen bei den RO etwas kleiner als der der chRCC mit 209,75. Nicht zuletzt ergibt auch die Einteilung in die vier Färbegrade in Teil C der Abbildung IV-33 eine tendenziell dunklere Färbung der RO als der

chRCC. Dort beträgt der Mittelwert des höchsten nennenswert gemessenen Färbegrads, des Färbegrad 1, bei den RO 24,1 % im Vergleich zu 16,7 % bei den RO. Insgesamt sind die Unterschiede allerdings auch bei der Auswertung mit IHC Profiler nicht sehr groß und nicht signifikant.

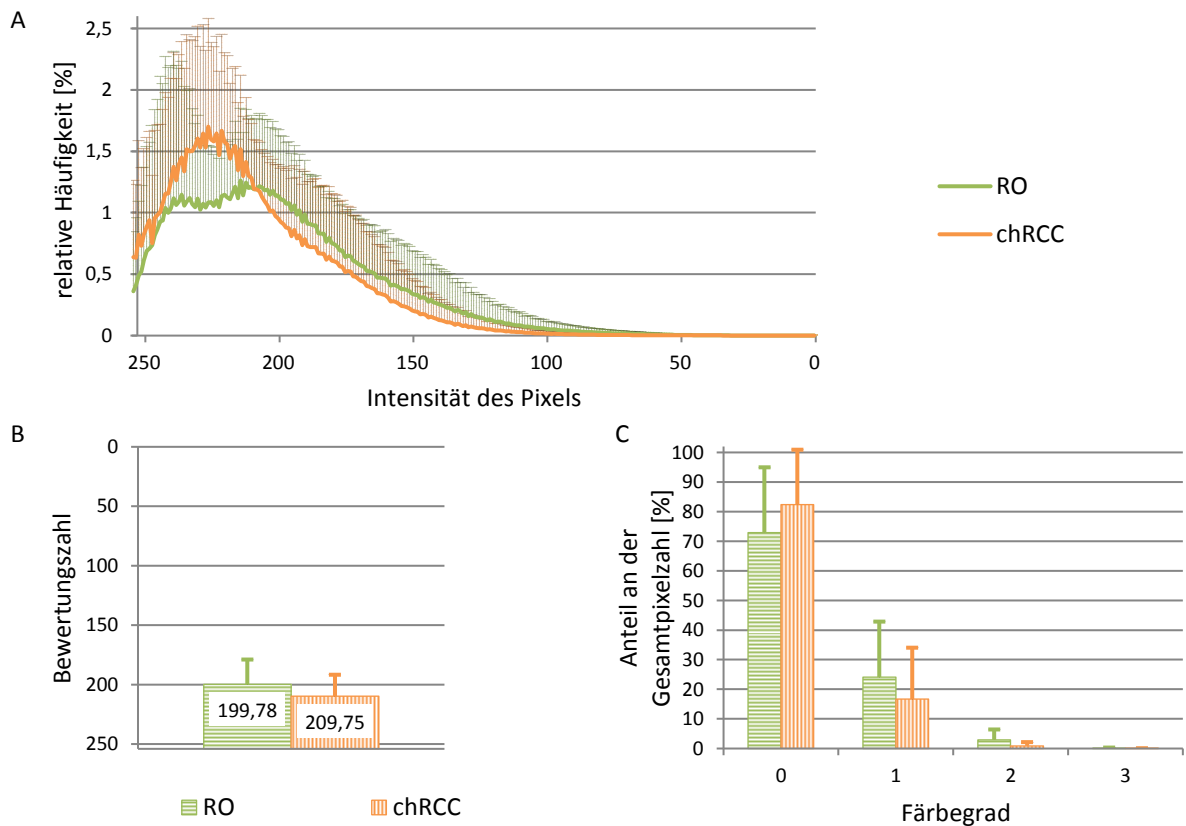


Abbildung IV-33. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von SORD mit IHC Profiler für die je sechs renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

2.3.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Die im vorausgehenden Abschnitt zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von SORD mit IHC Profiler beschriebene Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen aus der semiquantitativen Evaluation spiegelte sich im Pearson-Korrelationskoeffizienten für diese beiden Auswertverfahren wider. Wie in Teil C der Abbildung IV-34 dargestellt, betrug dieser 0,96. Somit korrelierten die Ergebnisse beider Auswertmethoden zur IHC im Falle der SORD sehr stark und außerdem hoch signifikant.

Im Gegensatz hierzu ließen die zu einander im Widerspruch stehenden Ergebnisse aus IHC und massenspektrometrischer Analyse keine Korrelation erwarten. Während durch letztere eine signifikant höhere Expression von SORD bei den chRCC im Vergleich zu den RO bestimmt wurde, ergab die IHC eine nicht signifikante Tendenz zu einer stärkeren Expression von SORD bei den RO im Vergleich zu den chRCC. Erwartungsgemäß zeigten die Ergebnisse dieser beiden Methoden im Falle der SORD keine lineare Korrelation. Die genauen Daten hierzu sind Teil A und B der Abbildung IV-34 zu entnehmen.

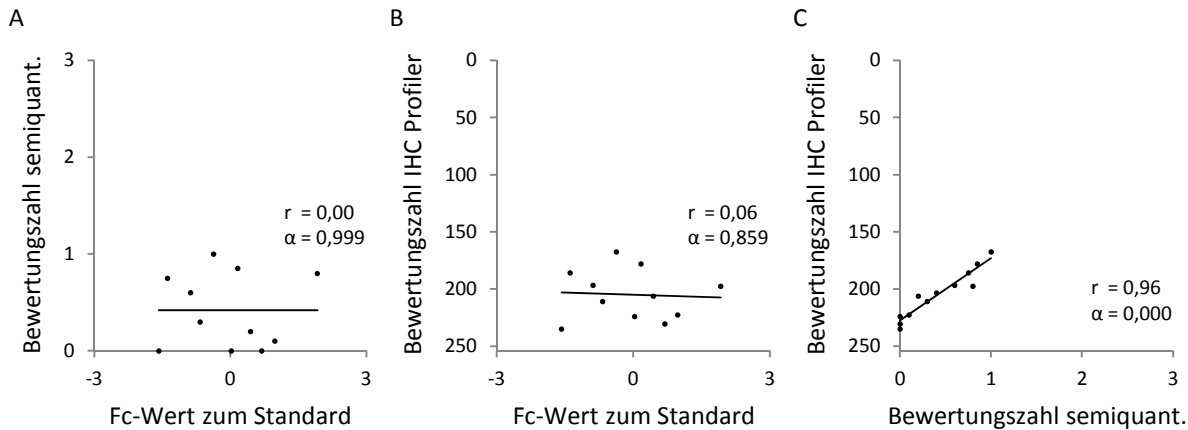


Abbildung IV-34. Pearson-Korrelationen der Ergebnisse zu SORD bei den je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

2.4 Retinol-Dehydrogenase 11

Im Gegensatz zu LAMP1 und SORD erfolgte die zusätzliche immunhistochemische Färbung der Retinol-Dehydrogenase 11 (RDH11) an den chRCC und RO unabhängig von den Ergebnissen der funktionellen Analyse. Für RDH11 wurde ebenfalls eine laut Limma und SAM signifikant höhere Expression in den chRCC im Vergleich zu den RO nachgewiesen. Der Unterschied zwischen den mittleren Fc-Werten betrug 1,35. Abgesehen von der Anreicherung der Proteine des endoplasmatischen Retikulums, in dessen Membran auch die RDH11 lokalisiert ist, ist diese keinem der signifikant angereicherten Motive zuzuordnen. Eine Expression der RDH11 ist sowohl für normale Epithelzellen der Prostata als auch für Prostatakarzinomzellen beschrieben. (LIN et al., 2001; KEDISHVILI et al., 2002; BELYAEVA et al., 2003) Eine neuere Publikation von KUMMALUE und Mitarbeiter (2015) beschreibt außerdem eine verstärkte Proliferation und reduzierte Apoptose bei RDH11 transduzierten Zellen im Zusammenhang mit der Erythropoese. Bezüglich der Expression der RDH11, geschweige denn deren Funktion bei chRCC wurden hingegen keine Publikationen gefunden. Aus diesem Anlass sollte das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse in Bezug auf RDH11 in der IHC weiter überprüft werden. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden ist in Abbildung IV-35 zu finden.

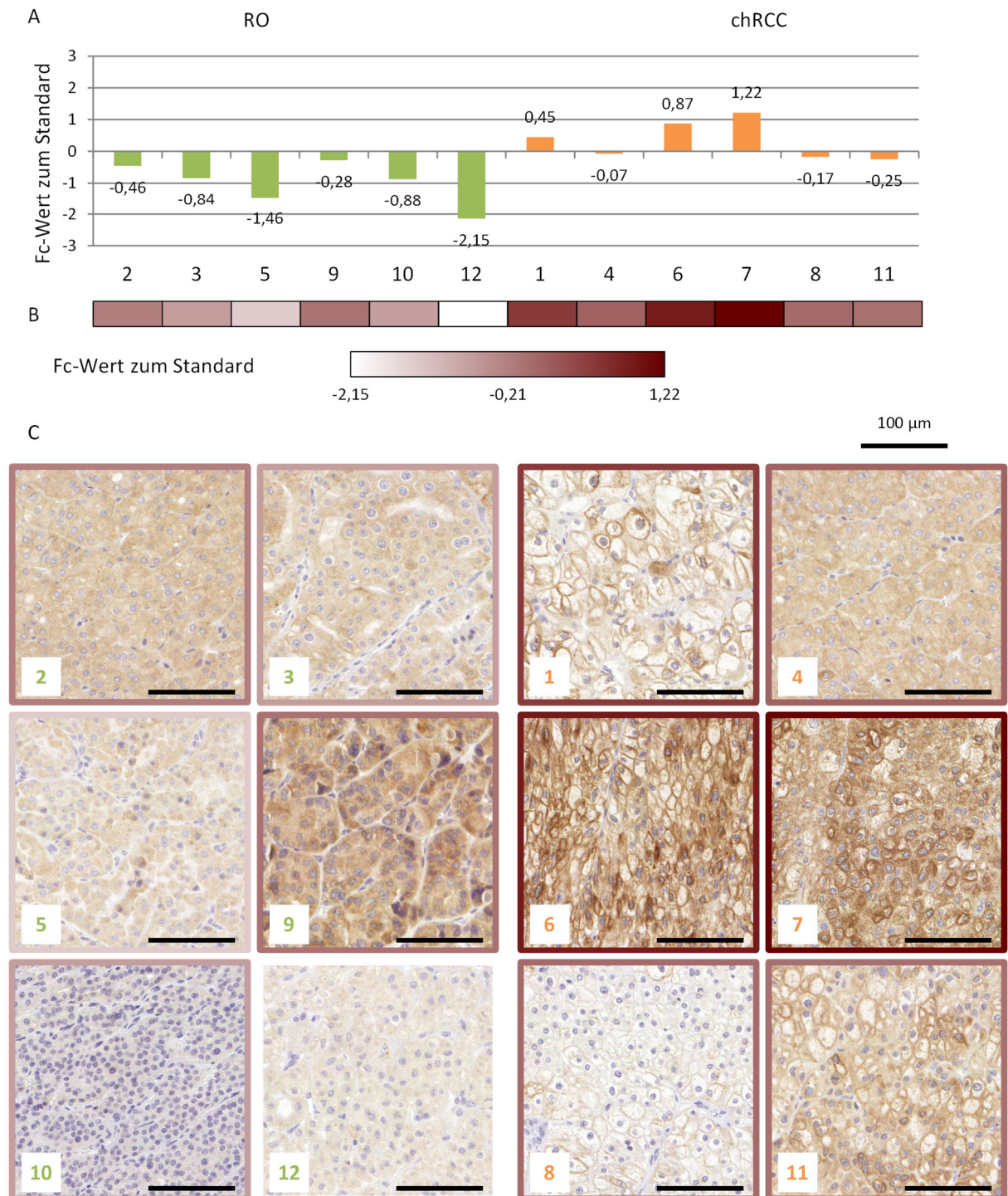


Abbildung IV-35. Expression der Retinol-Dehydrogenase 11 bei chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für die 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Entität sortiert (RO links, chRCC rechts). Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

2.4.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Korrespondierend zur Lokalisation der RDH11 im endoplasmatischen Retikulum erwies sich die immunhistochemische Färbung dieser als cytoplasmatisch. Sowohl die Tumorzellen der chRCC als auch der RO stellten sich dabei überwiegend schwach bis mäßig positiv da, während

die Zellen des Tumorstromas negativ waren. Auch im Zytoplasma der auf den meisten Schnitten vorhandenen Epithelzellen aller normalen Nierentubuli war eine meist mäßige in einigen Fällen stellenweise auch starke Expression von RDH11 mittels IHC nachweisbar. Diese fungierten daher als interne Kontrolle.

2.4.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

Die Ergebnisse der semiquantitativen Evaluation der mittels Antikörper gegen RDH11 immunhistochemisch gefärbten Schnitte sind in Abbildung IV-36 gezeigt. Wie bereits bei der qualitativen Beurteilung erwähnt, bestätigten die Mittelwerte der Flächenanteile sowohl für die RO als auch für die chRCC eine überwiegend schwache bis mäßige Färbung. Der Anteil mit der Färbintensität 3 betrug bei beiden Entitäten 0 %. Bei der, somit für die RDH11 höchsten beobachteten Intensität, Färbintensität 2, war der Mittelwert für die chRCC mit 28,3 % deutlich größer als die 9,2 % bei den RO. Aufgrund der großen Streuung war dieser Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen nicht signifikant. Ferner überwog nicht nur bei der für die RDH11 dunkelsten Färbintensität der mittlere Flächenanteil der chRCC jenen der RO, sondern auch bei der hellsten. Bei Färbintensität 0 lag dieser für die chRCC bei 26,7 % im Vergleich zu 6,7 % bei den RO. Aufgrund einer somit fehlenden Tendenz in Bezug auf eine stärkere Expression von RDH11 bei einer der beiden Gruppen ist der einzige signifikante Unterschied bei der semiquantitativen Evaluation wenig aussagekräftig. Dieser ließ sich für die Färbintensität 1 nachweisen. Der Mittelwert des Flächenanteils war hier mit 84,2 % bei den RO signifikant größer als die 45,0 % bei den chRCC.

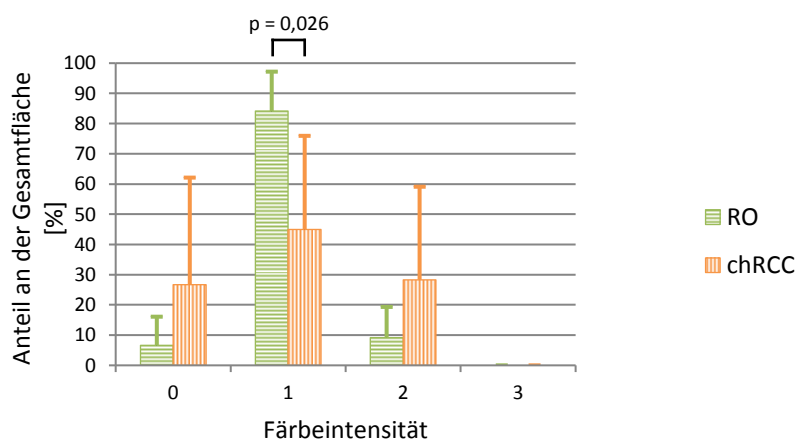


Abbildung IV-36. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von RDH11 bei den je sechs renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbintensitäten aufgetragen. (p = zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz)

2.4.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Durch die semiquantitative Evaluation wurde schon festgestellt, dass die chRCC in der IHC für RDH11 im Vergleich zu den RO nicht nur mehr dunkle, sondern auch mehr helle Areale aufwiesen. Dies bekräftigte bei der Auswertung mit IHC Profiler das Histogramm in Teil A der Abbildung IV-37. Hier liegen die mittleren relativen Häufigkeiten für die chRCC sowohl bei den hellen Pixelintensitäten von 254 bis 220 als auch bei den dunklen Pixelintensitäten von 160 bis 0 über jenen der RO. Zum Ausgleich ist dies im Bereich der Pixelintensitäten von 220 bis 160 andersherum. Insgesamt überwog jedoch der Flächenanteil bei den dunkleren Intensitäten

leicht. Dies erschließt sich aus den Mittelwerten der Bewertungszahlen in Teil B der Abbildung IV-37. Hierbei spricht der kleinere Wert von 184,30 bei den chRCC für eine stärkere Färbung im Vergleich zu den RO, deren mittlere Bewertungszahl 188,72 betrug. Dieser Unterschied ist allerdings nicht nur sehr gering, sondern auch nicht signifikant. Von besonderem Interesse ist die Einteilung in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Obwohl die detaillierte Verteilung der Pixel auf die verschiedenen Pixelintensitäten, wie bei der Betrachtung des Histogramms beschrieben, den Ergebnissen aus der semiquantitativen Evaluation entsprach, zeichnete sich bei der Einteilung durch IHC Profiler in Teil C der Abbildung IV-37 ein eindeutigeres Bild ab. Anhand des vergleichsweise großen Flächenanteils des Färbegrads 0 von 63,7 % bzw. 54,0 % wird deutlich, dass dieser Färbegrad bei IHC Profiler auch leicht dunklere Areale mit umfasste als die Färbeintensität 0 bei der semiquantitativen Evaluation. Hierdurch war der Mittelwert des Flächenanteils mit diesem Färbegrad bei den RO größer als bei den chRCC, während die chRCC mit 37,4 % im Vergleich zu 33,4 % im Mittel einen größeren Anteil mit Färbegrad 1 zeigten. Äquivalent zur semiquantitativen Evaluation lag der mittlere Flächenanteil der chRCC für den Färbegrad 2 mit 8,2 % über den 2,9 % der RO. Die im Vergleich zur semiquantitativen Evaluation geringeren absoluten Werte lassen darauf schließen, dass der Färbegrad 2 bei der Einteilung durch IHC Profiler erst ab einer dunkleren Pixelintensität beginnt als die Färbeintensität 2 bei der semiquantitativen Evaluation. Diese leichte Varianz in den Grenzen für die einzelnen Färbegrade führte im Falle der RDH11 dazu, dass die Bewertung des Ergebnisses der Einteilung durch IHC Profiler im Gegensatz zur semiquantitativen Evaluation in einer Tendenz zu einer stärkeren Expression von RDH11 durch die chRCC im Vergleich zu den RO resultiert. Diese Tendenz ist allerdings nicht signifikant.

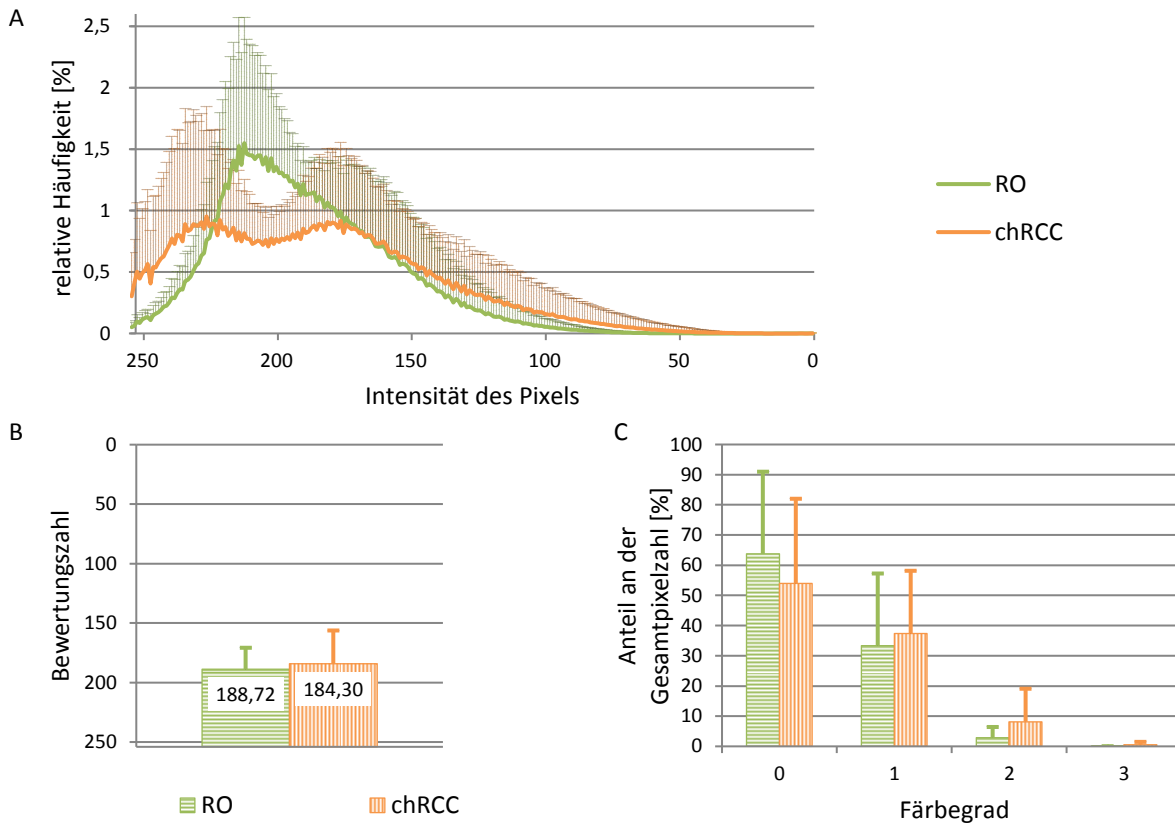


Abbildung IV-37. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von RDH11 mit IHC Profiler für die je sechs renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

2.4.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Auf die semiquantitative Evaluation und die Auswertung mit IHC Profiler der immunhistochemischen Färbungen von RDH11 folgte die Überprüfung der dabei gewonnenen Ergebnisse auf eine Korrelation mit den Ergebnissen aus der massenspektrometrischen Analyse. Die Resultate hieraus sind Teil A und B der Abbildung IV-38 zu entnehmen. Gemäß der nur leichten Tendenz zu einer stärkeren Expression von RDH11 durch die chRCC in Relation zu den RO als Ergebnis der Auswertung mit IHC Profiler bei einem eindeutigen und signifikanten Unterschied in der massenspektrometrischen Analyse, korrelierten diese beiden Methoden mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,52 nur mittelmäßig und nicht signifikant. Ebenfalls nicht signifikant und noch schwächer war die Korrelation zwischen den Ergebnissen aus der semiquantitativen Evaluation und der massenspektrometrischen Analyse.

Untereinander zeigten die beiden zur Auswertung der IHC verwendeten Methoden bei RDH11 hingegen eine sehr starke und hoch signifikante Korrelation. Wie in Teil C der Abbildung IV-38 dargestellt, betrug der Pearson-Korrelationskoeffizient hierbei 0,86. Dazu sei insbesondere in Bezug auf den Vergleich zwischen semiquantitativer Evaluation und Einteilung durch IHC Profiler in Kapitel IV.2.4.3 angemerkt, dass für den Test auf eine lineare Korrelation die von der Einteilung in die vier Färbegrade unabhängige Bewertungszahl heran gezogen wurde.

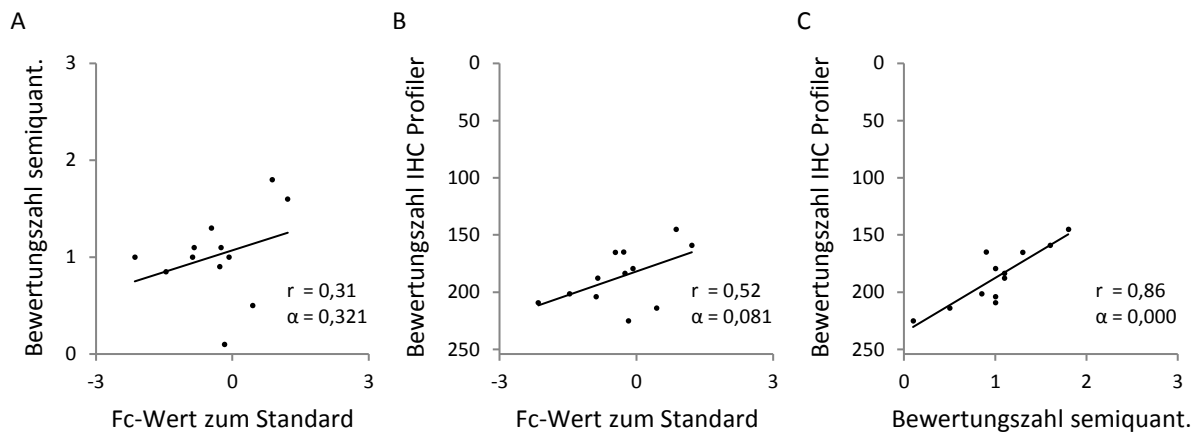


Abbildung IV-38. Pearson-Korrelationen der Ergebnisse zu RDH11 bei den je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

2.5 Integrin alpha-V

Die funktionelle Analyse der im RO im Vergleich zum chRCC signifikant vermehrt exprimierten Proteine ergab in erster Linie eine Anreicherung mitochondrialer Proteine. Dies überraschte aufgrund des bekannten Mitochondrienreichtums der Onkozyten nicht. Daher lag der Fokus bei der Auswahl eines geeigneten Proteins für eine weitere Untersuchung in der IHC aus dieser Gruppe auf den verbleibenden zwölf nicht mitochondrialen Proteinen. Bei der Recherche zu diesen stellte sich Integrin alpha-V (ITGAV) als interessantes Ziel heraus. Dieses membranäre Protein ist über die Bindung an der extrazellulären Matrix hinaus in Abhängigkeit von dessen Bindungspartner im Heterodimer an der Regulation verschiedener Signalwege beteiligt. Der Unterschied der mittleren Fc-Werte lag bei -1,71. Mit einem gemäßigten p-Wert im Limma von 0,000 war die Anreicherung bei den RO hoch signifikant.

Abbildung IV-39 zeigt neben den Ergebnissen aus der massenspektrometrischen Analyse für ITGAV repräsentative Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen dieses Proteins.

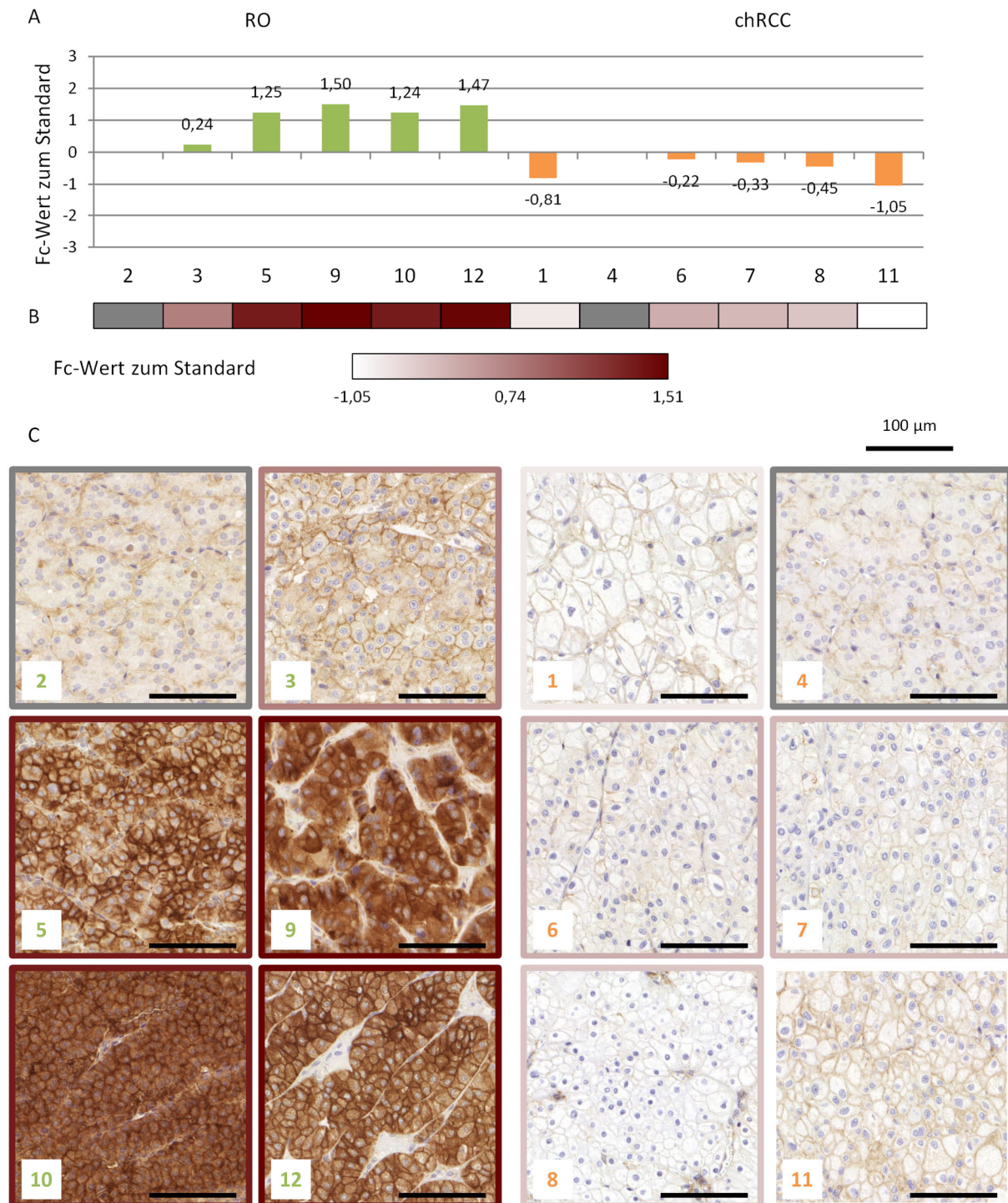


Abbildung IV-39. Expression des Integrin alpha-V bei chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen. A: Ergebnisse aus der Massenspektrometrie für 10 der 12 Tumorproben in Form des jeweils aus dem Verhältnis zum Standard berechneten Fc-Werts. Für die Proben 2 und 4 konnte das Verhältnis durch MaxQuant nicht quantifiziert werden. B: Farbcodierung dieser Fc-Werte. C: Ausschnitte aus den immunhistochemischen Färbungen für alle 12 Patientenproben nach Entität sortiert (RO links, chRCC rechts). Die Rahmenfarbe der Bilder ergibt sich aus B und repräsentiert somit den für die jeweilige Probe gemessenen Fc-Wert. (Maßstab: Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

2.5.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Die membranäre Färbung von ITGAV in der IHC variierte bei den Tumorzellen von negativ bis stark positiv. Mit zunehmender Intensität erschien auch das Zytoplasma der Tumorzellen

schwach bis mäßig positiv. Das Tumorstroma war allenfalls schwach gefärbt, jedoch stellten sich die Endothelzellen durchweg mäßig bis stark gefärbt dar. Dem entsprechend zeichneten sich die Glomerula im meist vorhandenen normalen Nierengewebe durch eine mäßige bis starke Positivität deutlich ab. Die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli waren meist negativ oder zeigten eine schwache Färbung der basalen Membran. Die Färbeintensität der übrigen Tubulusepithelien reichte von mäßig bis stark, wobei die intermediären Tubuli in der Markzone meist mäßig gefärbt waren.

2.5.2 Semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Reaktionen

In der semiquantitativen Evaluation der mittels Antikörper gegen ITGAV immunhistochemisch gefärbten, zuvor massenspektrometrisch analysierten Fälle stellte sich der Anteil stark positiver Membranen sowohl bei den Tumorzellen der RO als auch denen der chRCC als gering heraus. Der Mittelwert des Flächenanteils bei Färbeintensität 3 belief sich hierbei auf 2,0 % für die RO bzw. 0,2 % für die chRCC. Die in Abbildung IV-40 abgebildete Verteilung auf die verbleibenden drei Färbeintensitäten divergierte zwischen den RO und chRCC deutlich und hoch signifikant. Während die Färbungen mit einem mittleren Flächenanteil von 85,5 % bei Färbeintensität 0 und 13,5 % bei Färbeintensität 1 für die chRCC überwiegend negativ mit einem geringen schwach gefärbten Anteil ausfielen, betrug der Mittelwert des Flächenanteils bei Färbeintensität 0 für die RO 0 %.

Letztere zeigten mit einem mittleren Flächenanteil von 68,8 % nicht nur einen deutlich höheren Anteil bei der Färbeintensität 1, sondern mit im Mittel 29,2 % auch einen nicht unerheblichen Anteil bei Färbeintensität 2. Zusammenfassend bestätigte die semiquantitative Evaluation der immunhistochemischen Färbungen deutlich und hoch signifikant eine stärkere Expression von ITGAV durch die RO im Verhältnis zu den chRCC.

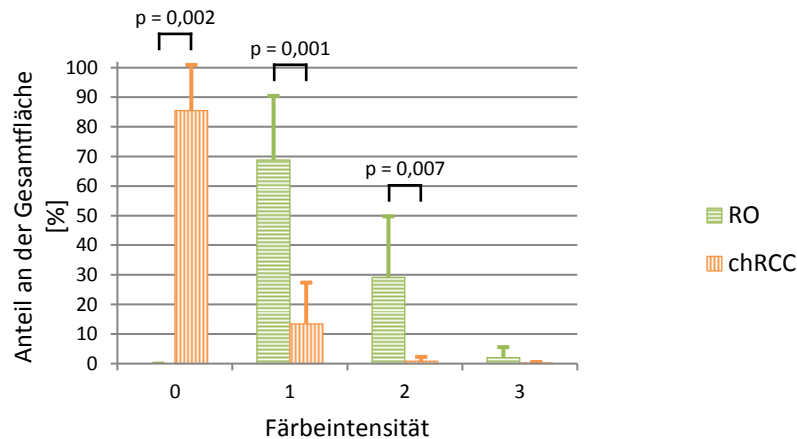


Abbildung IV-40. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von ITGAV bei den je sechs renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen, die mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test bei Färbeintensität 0 und 2 bzw. zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz bei Färbeintensität 1)

Zur weiteren Validierung dieses sehr deutlichen und hoch signifikanten Unterschieds zwischen chRCC und RO bei der Expression von ITGAV am initial analysiertem Kollektiv folgte die immunhistochemische Färbung der zusätzlichen 42 RO und 31 chRCC mit Antikörper gegen ITGAV. Das Ergebnis der semiquantitativen Evaluation dieser weiterführenden Färbungen ist Ab-

bildung IV-41 zu entnehmen. Obgleich die hierbei ermittelte Verteilung auf die vier Färbeintensitäten für diese Fälle nicht identisch zu jener der zwölf zuerst untersuchten Fälle war, belegte das Ergebnis hoch signifikant eine stärkere Expression von ITGAV beim RO im Vergleich zum chRCC.

Konkret wurden bei den 73 weiteren Fällen auch nennenswerte Flächenanteile mit einer starken Membranfärbung detektiert. Hierbei war der Mittelwert der Flächenanteile der Färbeintensität 3 bei den RO mit 13,4 % signifikant größer als die 2,8 % bei den chRCC. Auch bei der Färbeintensität 2 zeigten die zusätzlich gefärbten Fälle größere mittlere Flächenanteile als dies bei dem kleinen Kollektiv der Fall war. Mit 60,8 % im Vergleich zu 25,1 % lag dieser ebenfalls für die RO hoch signifikant über dem der chRCC. Dem entsprechend erwiesen sich die Flächenanteile bei den Färbeintensitäten 0 und 1 bei den chRCC mit im Mittel 21,4 % und 50,3 % als größer als die entsprechenden Werte der RO. Mit einem Mittelwert von 0,2 % bei der Färbeintensität 0 waren auch bei den 42 nachträglich gefärbten RO kaum Areale mit ITGAV-negativen Tumorzellmembranen zu finden. Der Mittelwert des Flächenanteils mit der Färbeintensität 1 betrug bei den RO 25,3 %. Somit ergab die semiquantitative Evaluation der zusätzlich gefärbten Fälle im Vergleich zu den zwölf initial gefärbten unabhängig von der Entität eine dunklere Färbung für ITGAV. Bei den chRCC dominierten hierbei die schwach gefärbten Anteile und bei den RO die mäßig gefärbten.

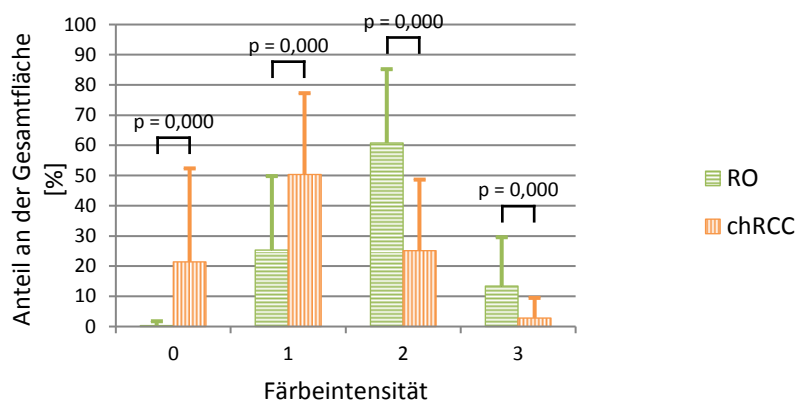


Abbildung IV-41. Ergebnis der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen von ITGAV bei 42 renalen Onkozytomen und 31 chromophoben Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Für die beiden Vergleichsgruppen ist die Aufteilung der ausgewerteten Gesamtfläche auf die vier Färbeintensitäten in Form der jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen der prozentualen Flächenanteile der vier Färbeintensitäten aufgetragen. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test)

2.5.3 Auswertung mit IHC Profiler in ImageJ

Im Anschluss an die semiquantitative Evaluation erfolgte für alle immunhistochemischen Färbungen von ITGAV eine Auswertung mit IHC Profiler. Hierbei gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass eine Unterscheidung zwischen Zytoplasma und Zellmembran nicht in IHC Profiler implementiert ist. Daher bewirkt das negative Zytoplasma bei einer reinen membranären Färbung ein niedrigeres Ergebnis bei der Auswertung mit IHC Profiler, als die in Wirklichkeit vorliegende Färbung bei einer alleinigen Betrachtung der Membranen ergeben würde. Nach dem gleichen Prinzip erhöht im Falle des ITGAV die in der semiquantitativen Evaluation nicht mit einbezogene, bei der qualitativen Beurteilung erwähnte, unspezifische, bei höheren Intensitäten der membranären Färbung auftretende, cytoplasmatische Färbung das Ergebnis.

Trotz dieser Einschränkungen korrespondierten die Ergebnisse der Auswertung mit IHC Profiler mit jenen aus der semiquantitativen Evaluation. Auch hierbei stellte sich hoch signifikant eine stärkere Expression von ITGAV bei den RO in Relation zu den chRCC heraus.

Die detaillierten Ergebnisse für das kleinere, initial gefärbte Kollektiv sind in Abbildung IV-42 dargestellt. In Teil A dieser Abbildung spiegelt sich die überwiegend negative Färbung mit geringen schwach gefärbten Anteilen der chRCC in den großen Mittelwerten der relativen Häufigkeiten bei den Pixelintensitäten 250 bis 200 wider. Im Vergleich hierzu waren Pixel mit diesen Intensitäten im Mittel bei den RO selten. Bei diesen verteilten sich die Pixel im Mittel mehr oder weniger gleichmäßig auf die dunkleren Intensitäten 200 bis 50. Dieser Unterschied war, wie sich aus den anhand dieser relativen Häufigkeiten für jeden Fall berechneten Bewertungszahlen ergab, hoch signifikant. In Teil B der Abbildung IV-42 sind die Mittelwerte dieser Bewertungszahlen aufgetragen. Der kleinere Wert von 130,06 bei den RO spricht für eine stärkere Färbung im Vergleich zu dem größeren Wert von 223,22 bei den chRCC. Teil C der Abbildung IV-42 beinhaltet die Einteilung aller Pixel in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Da, wie bereits erörtert, hierbei auch das negative Zytoplasma der Zellen mit positiver Zellmembran zu Färbegrad 0 gezählt wurde, war der mittlere Flächenanteil bei diesem Färbegrad mit 27,4 % bei den RO und 93,0 % bei den chRCC für beide Entitäten größer als bei Färbeintensität 0 der semiquantitativen Evaluation. Mit einem Mittelwert von 6,5 % bei Färbegrad 1 und keinen nennenswerten Anteilen bei den Färbegraden 2 und 3 nahmen positive Membranen im Falle der chRCC nur einen geringen Teil an der Gesamtpixelzahl ein. Demgegenüber machten diese bei den RO mit 27,0 %, 28,9 % und 16,7 % bei den Färbegraden 1, 2 und 3 nahezu drei Viertel der Gesamtpixelzahl aus. Selbst bei Abzug der durch IHC Profiler mit gewerteten, unspezifischen, cytoplasmatischen Färbung, die bei stärkerer membranärer Färbung auftrat, ist zu erwarten, dass die für alle vier Färbegrade ermittelten deutlichen und hoch signifikanten Unterschiede auch bei einer Auswertung mit IHC Profiler für das initial untersuchte Kollektiv signifikant bleiben.

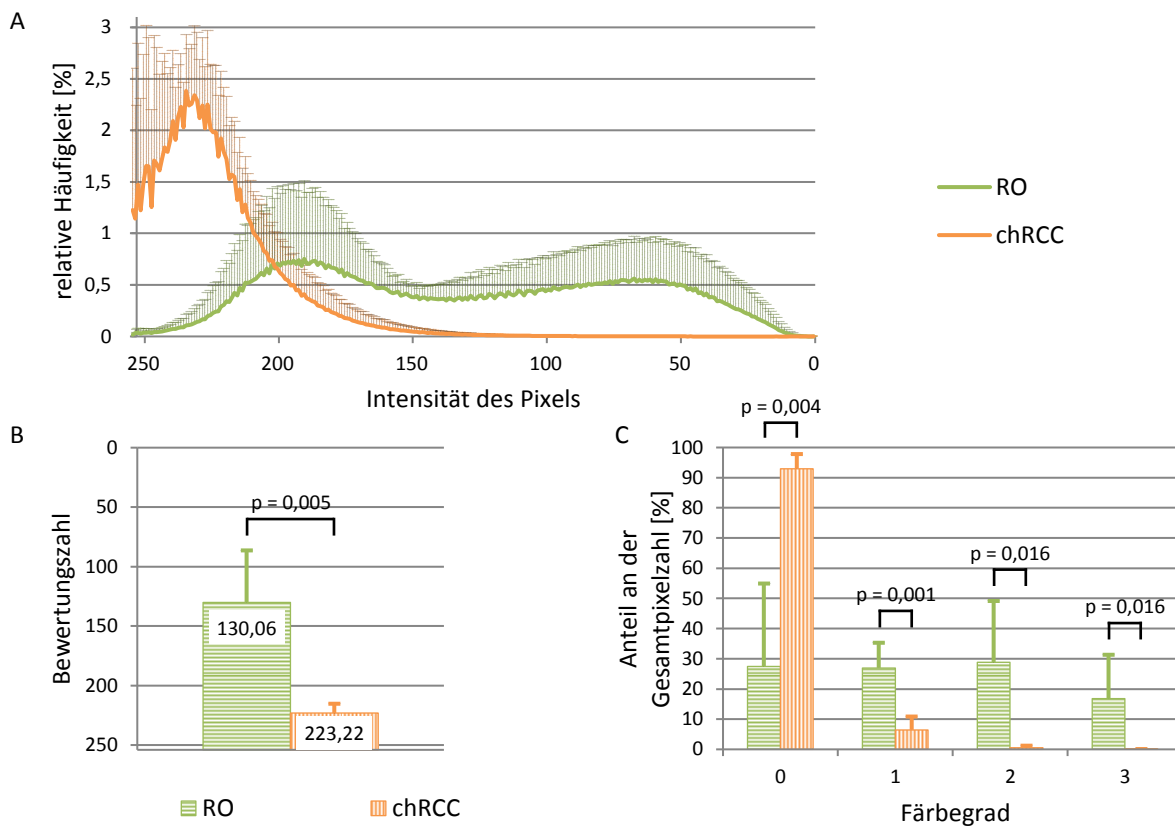


Abbildung IV-42. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von ITGAV mit IHC Profiler für die je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytome und chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen der sechs RO und sechs chRCC. ($p = 0,005$, zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit unterschiedlicher Varianz) C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. ($p = 0,004$, zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test bei den Färbegraden 0, 2 und 3 bzw. zweiseitige Signifikanz, t-Test für unabhängige Variablen mit gleicher Varianz bei Färbegrad 1)

Ferner sind die Ergebnisse der Auswertung der zusätzlichen Fälle, die mittels Antikörper gegen ITGAV gefärbt wurden, im Detail Abbildung IV-43 zu entnehmen. Auch hier wirkte sich der unerwünschte Einfluss des Zytoplasmas auf die in Teil C dieser Abbildung dargestellte Einteilung in die vier Färbegrade aus. Dadurch lagen die Mittelwerte der Flächenanteile bei den Färbegraden 0 und 3 bei der Auswertung mit IHC Profiler für beide Entitäten über jenen der entsprechenden Farbeintensitäten bei der semiquantitativen Evaluation dieser Färbungen. Konkret beliefen sich die Mittelwerte der Flächenanteile auf 31,2 %, 32,1 %, 26,2 % und 10,5 % bei den chRCC bzw. 6,7 %, 17,6 %, 32,2 % und 43,5 % bei den RO für die Färbegrade 0, 1, 2 und 3. Somit verteilten sich die Pixel bei dem großen Kollektiv sowohl für die RO als auch für die chRCC auf alle vier Färbegrade. Bei den chRCC überwogen mit im Mittel 63,3 % der Gesamtpixelzahl die Färbegrade 0 und 1. Die Mittelwerte der Flächenanteile für die chRCC waren bei diesen beiden Graden hoch signifikant größer als jene der RO. Bei letzteren dominierten mit im Mittel 75,7 % hingegen die Färbegrade 2 und 3, wobei nur bei Färbegrad 3 der Unterschied zwischen den Mittelwerten der RO und chRCC hoch signifikant war. Nicht nur die bei beiden Entitäten höheren prozentualen Anteile bei den Färbegraden 2 und 3 im Falle des größeren Kollektivs in Relation zu den Mittelwerten des initial gefärbten Kollektivs, sondern auch die kleineren Mittelwerte von 83,83 und 145,43 der Bewertungszahlen in Teil B der Abbildung IV-43 attestieren eine stärkere

Färbung der zusätzlich gefärbten 73 Fälle im Vergleich zu den ursprünglichen zwölf. Diese, zuvor bei der semiquantitativen Evaluation ausgeführte Gegebenheit, wird ebenso durch die Histogramme in Teil A der Abbildung IV-43 verdeutlicht. Anstelle sich wie beim kleinen Kollektiv auf die Intensitäten 250 bis 200 zu konzentrieren, verteilten sich die Pixel bei den 31 zusätzlich gefärbten chRCC im Mittel auf nahezu alle Intensitäten, wobei die Intensitäten von 225 bis 100 am häufigsten waren. Die gleichmäßige Verteilung vor allem auf die Intensitäten 200 bis 50 bei den sechs, zuvor massenspektrometrisch analysierten RO, wich bei dem großen Kollektiv einer im Mittel überwiegend dunklen Färbung. Hierbei waren die Mittelwerte der relativen Häufigkeiten bei den dunklen Intensitäten 50 bis 0 am größten. Die sich hieraus für den Vergleich zwischen RO und chRCC ergebende, stärkere Expression von ITGAV durch die RO ist in Bezug auf die aus den Verteilungen auf die Pixelintensitäten berechneten Bewertungszahlen auch für das erweiterte Kollektiv hoch signifikant (siehe Teil B der Abbildung IV-43).

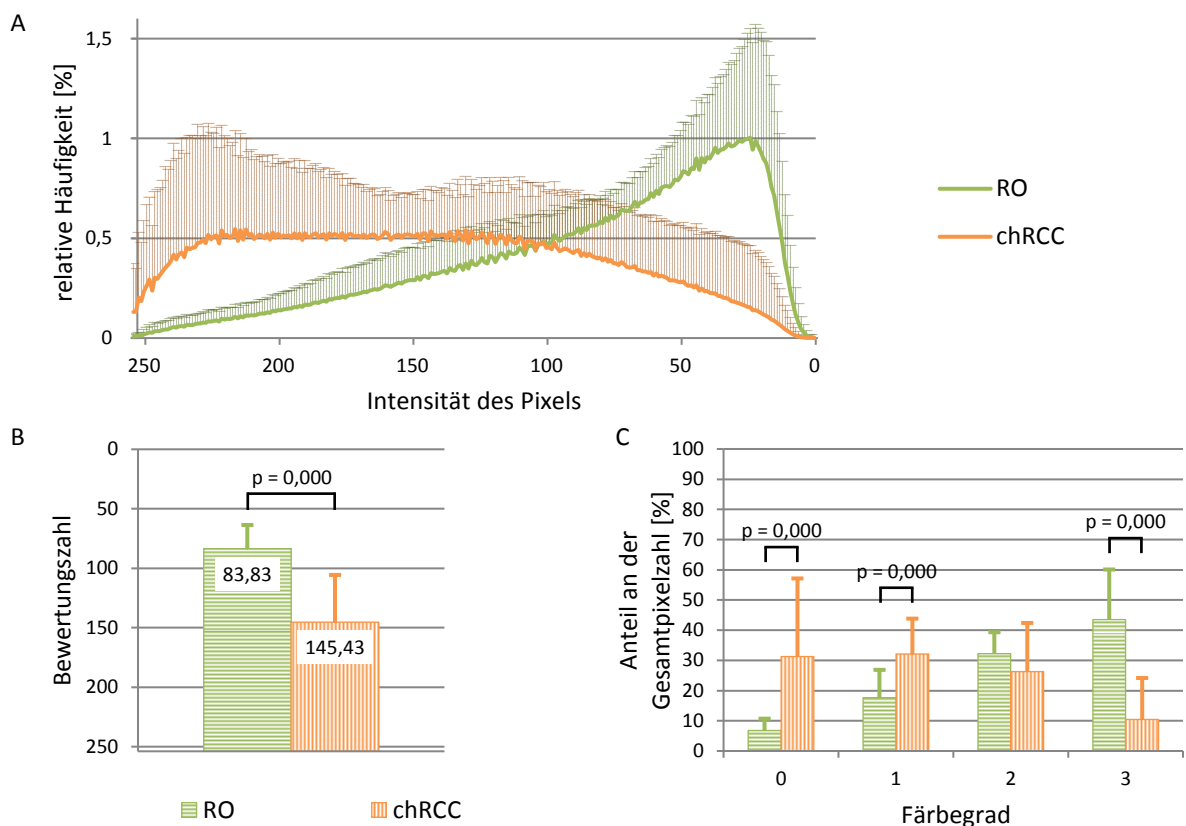


Abbildung IV-43. Ergebnis der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von ITGAV mit IHC Profiler für die zusätzlich gefärbten 42 renalen Onkozytome und 31 chromophoben Nierenzellkarzinome. A: Mittelwerte der relativen Häufigkeiten beider Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Pixelintensitäten 254 bis 0. B: Mittelwerte der Bewertungszahlen mit den jeweiligen Standardabweichungen der 42 RO und 31 chRCC. C: Aufteilung der Gesamtfläche in die vier Färbegrade durch IHC Profiler. Aufgetragen sind für die beiden Gruppen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. (p = zweiseitige, asymptotische Signifikanz, Mann-Whitney-U-Test)

2.5.4 Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden

Die Ergebnisse aus der IHC bekräftigten ausnahmslos die im Zuge der massenspektrometrischen Analyse statuierte signifikant höhere Expression von ITGAV beim RO im Vergleich zum chRCC. Diese Übereinstimmung der Ergebnisse beider verwendeten Methoden spiegelte sich in einer sehr starken und hoch signifikanten Korrelation zwischen diesen wider. Eine genaue Betrachtung der entsprechenden Korrelationskoeffizienten in Teil A und B der Abbildung IV-44

lässt hierbei nur einen geringen Unterschied in Abhängigkeit von dem für die IHC verwendeten Auswertverfahren erkennen. Demnach korrelierten die Ergebnisse der reinen Beurteilung der membranären Färbung im Rahmen der semiquantitativen Evaluation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,91 etwas besser mit jenen aus der massenspektrometrischen Analyse als die durch das Zytoplasma beeinflussten Ergebnisse der Auswertung mit IHC Profiler. Für die Korrelation letzterer mit den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie ergab sich ein Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho von 0,84.

Dem entsprechend resultierte aus den Tests auf lineare Korrelationen auch für die beiden unterschiedlichen Auswertmethoden der IHC eine hoch signifikante und sehr starke Korrelation der Ergebnisse. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho lag für das kleinere, initial gefärbte Kollektiv bei 0,96 (siehe Teil C der Abbildung IV-44). Mit einem Wert von 0,79 für selbigen im Falle der 73 weiterführend gefärbten Tumorschnitte wurde für das große Kollektiv eine schwächere Korrelation zwischen diesen beiden Auswertverfahren bestimmt. Diese war, wie in Abbildung IV-45 ersichtlich wird, dennoch hoch signifikant und fast noch sehr stark.

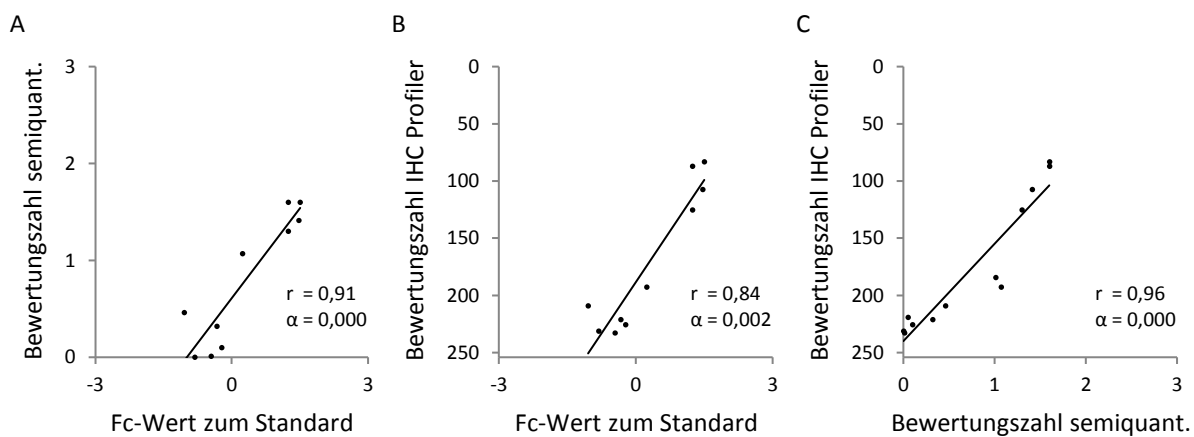


Abbildung IV-44. Korrelationen der Ergebnisse zu ITGAV bei den je sechs mittels Massenspektrometrie analysierten renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen. A und B: Korrelationen der aus den mittels Massenspektrometrie ermittelten Verhältnissen der Tumorproben zum Standard berechneten Fc-Werte und der Bewertungszahl aus der IHC bei semiquantitativer Evaluation (A) und bei Auswertung mit IHC Profiler (B). C: Korrelation zwischen diesen beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden. (r = Pearson-Korrelationskoeffizient bei A bzw. Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho bei B und C, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

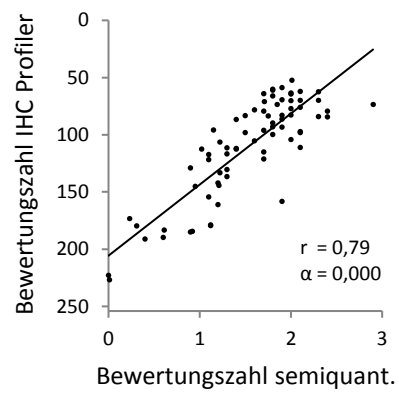


Abbildung IV-45. Korrelation zwischen den beiden zur IHC Auswertung verwendeten Methoden bei den Färbungen von ITGAV bei den 42 renalen Onkozytomen und 31 chromophoben Nierenzellkarzinomen, die nicht mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. (r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, α = zweiseitiges Signifikanzniveau)

V DISKUSSION

1 Verwendete Methoden

1.1 Massenspektrometrische Analyse

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten für die beiden Proteomvergleiche 3 044 bzw. 4 248 Proteingruppen identifiziert und 2 190 bzw. 3 126 quantifiziert werden. Davon wurden 1 139 bzw. 1 635 Proteingruppen in mindestens vier der sechs Proben gleichzeitig quantifiziert und standen somit für den jeweiligen Proteomvergleich zur Verfügung. In einem Review zu proteomischen Analysen an FFPE-Gewebe führen GUSTAFSSON und Mitarbeiter (2015) 59 Veröffentlichungen auf, bei denen ebenfalls Proteine aus FFPE-Gewebe nach einer Proteolyse („bottom-up“-Verfahren) massenspektrometrisch vermessen wurden. Im Mittel konnten bei einer vorherigen Fraktionierung der Proben in diesen Studien $2\,462 \pm 2\,279$ Proteine identifiziert werden. Die erzielte Proteomabdeckung kann somit im Verhältnis zu vergleichbaren Arbeiten als gut bewertet werden.

In Relation zu den Anzahlen bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen waren die für den Vergleich zwischen chromophoben Nierenzellkarzinomen und renalen Onkozytomen erreichten Zahlen um etwa 40 % größer. Eine mögliche Begründung hierfür ist in der Probenaufbereitung zu finden. Während im Falle der chRCC und RO für alle Proben genug Protein extrahiert werden konnte bzw. die mit der Aufbereitung einhergehenden Verluste klein genug waren, um genügend Material für eine Fraktionierung mittels HPLC zur Verfügung zu haben, war dies bei den ccRCC nicht für alle Proben der Fall. Eine stufenweise Fraktionierung mittels StageTips liefert vermutlich eine nicht ganz so gute Fraktionierung, wie sie durch die kontinuierliche Elution bei der HPLC erzielt werden kann.

Bei der Validierung der Standards zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den Ergebnissen für den Standard der ccRCC und dem der RO und chRCC. Bei beiden korrelierten für alle Proben die aus der Differenz der Fc-Werte der beiden Patientenproben jeweils zum Standard errechneten Werte sehr stark mit den aus den direkt quantifizierten Verhältnissen dieser beiden Patientenproben errechneten Fc-Werten. Die Korrelationen zeigten Pearson-Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,93 und waren alle hoch signifikant. Die Abweichungen der über den Standard ermittelten Fc-Werte von den aus dem direkt gemessenen Verhältnis berechneten lagen im arithmetischen Mittel aller Proteingruppen einer Probe bei 0,01 bis maximal 0,20 mit Standardabweichungen zwischen 0,18 und 0,43. Diese Werte liegen teilweise im Bereich der durch das Dimethyl-Label bedingten Abweichungen von im Betrag $0,007 \pm 0,137$ und $0,021 \pm 0,233$. Für die Ermittlung dieser publizierten Werte wurde ein Verhältnis zwischen den einzelnen Proteinen von 1:1:1 gewählt. (BOERSEMA et al., 2008) Im Rahmen der hier durchgeführten Analyse entsprach dies den Verhältnissen des Gesamtproteins zwischen den einzelnen Patientenproben und dem Standard. Liegt das Mischungsverhältnis bei 1:0,5 oder 1:0,1, so sind aufgrund eines kleineren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses größere labelbedingte Abweichungen ermittelt worden. Dort erfolgte eine Normalisierung zu den erwarteten Verhältnissen, weshalb kein Vergleich zur mittleren Abweichung möglich ist. Die Standardabweichungen bei einem Label durch Dimethylierung lagen mit 0,34 und 0,75 (ALTELAAR et al., 2013) allerdings teilweise über den im Rahmen dieser Arbeit festgestellten. Zwar wurde bei letzterer das Gesamtprotein im Verhältnis 1:1:1 gemischt, da sich die Patientenproben in den einzelnen Proteinen zum Teil unterschieden, lagen für diese jedoch verschiedene Mischungsverhältnisse vor.

Ein Vergleich der Abweichungen mit jenen bei Verhältnissen von 1:0,5 bzw. 1:0,1 ist somit gerechtfertigt und zeigt, dass die für den Standard ermittelten Abweichungen mit der durch die Dimethylierung bedingten Variation erklärbar sind. Aufgrund der guten Korrelationen und vergleichsweise geringen Abweichungen erwiesen sich die eingesetzten Standards somit als dazu geeignet, eine von der Probenpaarung unabhängige relative Quantifizierung aller Patientenproben eines Kollektivs zu ermöglichen.

Die in den Kapiteln V.2.2 und V.3.2 für die ccRCC getrennt von den RO und chRCC diskutierten Unterschiede im Proteom beschränken sich auf Proteingruppen, die in beiden der jeweiligen Vergleichsgruppen quantifiziert wurden. Prinzipiell wären allerdings auch jene Proteine von besonderem Interesse, die nur von einer Gruppe exprimiert werden. Für die ccRCC wurden bei 102 Proteinen und für die RO und chRCC bei 70 Proteinen nur das Verhältnis für die Patientenprobe der einen Gruppe zum Standard quantifiziert. Betroffen war allerdings fast immer nur eine, selten auch einmal zwei der sechs Patientenproben einer Gruppe. Zudem handelte es sich bei der quantifizierten Probe meistens um die medium gelabelte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ursache hierfür nicht in der Biologie der verglichenen Neoplasien begründet ist. Vielmehr scheinen die für das schwere Label eingesetzten Isotope weniger stabil oder unreiner zu sein, so dass der damit gelabelte Probenanteil bei einzelnen Proteinen nicht quantifiziert wurde. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass nicht nur das für das schwere Label eingesetzte Formaldehyd ein zusätzliches Isotop enthielt, sondern auch Natriumcyanoborodeuterid zwei Isotope enthält. Da diese Reagenzien nie zu 100 % rein und stabil sind, steigt mit der Anzahl an verwendeten Isotopen auch die Wahrscheinlichkeit, dass einmal ein Isotop fehlt. Die unterschiedliche Anzahl an Isotopen beeinflusst hingegen die Fraktionierung im Falle der eingesetzten starken Kationenaustauscher nicht. Darüber hinaus führt die größere Anzahl an im Vergleich zu Wasserstoff etwas hydrophilerem Deuterium zwar zu einer Veränderung der Retentionszeit der schwer gelabelten Proteine bei der dem Massenspektrometer vorgeschalteten Reversed-Phase-Chromatographie, eine Beeinflussung der Quantifizierung ist hierdurch allerdings ebenfalls nicht zu erwarten. (BOERSEMA et al., 2008) Unter der Annahme, dass es sich um methodische und nicht biologische Ursachen für die Quantifizierung einzelner Proteine für nur eine Gruppe handelte, fand keine genauere Betrachtung dieser statt. Umso wichtiger ist es, dass bei den beiden zu vergleichenden Gruppen stets die gleiche Anzahl von Proben medium und schwer und nicht die eine Gruppe so und die andere Gruppe anders gelabelt wurde.

1.2 IHC zur Validierung von Ergebnissen aus der Massenspektrometrie

Die immunhistochemischen Färbungen für, anhand der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse ausgewählte Proteine, dienten zunächst einmal rein qualitativ der Bestimmung der Zellen des Tumorgewebes, die das jeweilige Protein exprimieren. Hierbei konnte für alle untersuchten Proteine eine Expression im zu erwartenden Zellkompartiment der Tumorzellen nachgewiesen werden. Im Tumorstroma zeigten bei CD13 und VCP die Endothelzellen und andere Zellen des Tumorstromas und bei ITGAV vornehmlich die Endothelzellen eine Positivität. Im Gegensatz hierzu traten bei CNDP2 nur vereinzelt Zellinfiltrate stark positiver Zellen zwischen den Tumorzellen auf, bei LAMP1 präsentierten sich die Zellen des Tumorstromas meist negativ und für SORD sowie RDH11 demonstrierte das Tumorstroma keine Reaktivität. Bei der semiquantitativen Evaluation der immunhistochemischen Färbungen werden ausschließlich die Tumorzellen beurteilt. Bei dem Vergleich der dabei erhaltenen Ergebnisse mit jenen aus der massenspektrometrischen Analyse stellte sich heraus, dass diese für CD13 stark und für ITGAV sehr stark miteinander korrelieren. Für VCP wurde hierbei eine mittlere, aller-

dings fast starke Korrelation bestimmt. Hieraus lässt sich schließen, dass bei diesen drei Proteinen auch die durch die massenspektrometrische Analyse ermittelten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen vornehmlich auf eine abweichende Expression durch die Tumorzellen selbst zurück zu führen sind. In Bezug auf die angewandte mikroskopisch kontrollierte Makrodissektion lässt sich somit resümieren, dass diese bei renalen Neoplasien auch dann dazu geeignet ist das Proteom der Tumorzellen zu vergleichen, wenn die quantifizierten Proteine zusätzlich im mitdissektierten Tumorstroma exprimiert werden.

Obgleich bei CNDP2 nur vereinzelt stark positive Zellen im Tumorstroma auftraten und dieses bei SORD und RDH11 negativ war, bestand bei CNDP2 und SORD keine und bei RDH11 nur eine schwache bis mittelmäßige, nicht signifikante lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen der IHC und der massenspektrometrischen Analyse. Dem entsprechend konnten die bei letzterer festgestellten, signifikanten Unterschiede nicht durch die IHC validiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit lag die Quote für eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen IHC und massenspektrometrischer Analyse folglich bei vier von sieben Proteinen. Üblicherweise werden in Veröffentlichungen nur einzelne Proteine aus einer durch die massenspektrometrische Analyse generierten Liste mit potentiellen Biomarkern für eine Validierung durch die IHC ausgewählt. So gibt es zahlreiche Beispiele, bei denen für häufig ein bis zwei, bis zu maximal vier Proteine eine Verifizierung der Ergebnisse aus dem proteomischen Vergleich zwischen nicht neoplastischem Nierengewebe und ccRCC mittels IHC möglich war. (UNWIN et al., 2003; PERROUD et al., 2006; LICHTENFELS et al., 2009; ATRI et al., 2014; WHITE et al., 2014; LEBDAI et al., 2015; ZHAO et al., 2015) Bei diesen variierte die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen von einer reinen Beschreibung bis zur Anwendung eines Scores der meist anhand des Anteils positiver Zellen ermittelt wurde. Angaben darüber, ob auch bei anderen Studien weitere Proteine untersucht wurden, bei denen keine Korrelation zwischen den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse und der IHC vorlag, sind hingegen schwer zu finden. Die wenigen Aussagen hierzu bestätigen jedoch, dass auch bei anderen Arbeitsgruppen die Verifizierung massenspektrometrischer Ergebnisse durch die IHC nicht immer erfolgreich ist. So erwähnen SELIGER und Mitarbeiter (2005), dass von den drei von ihnen zur Validierung ihrer massenspektrometrischen Ergebnisse eingesetzten, kommerziell erhältlichen Antikörpern zwei nicht aussagekräftig waren und nur einer eine Reaktivität in der IHC zeigte. CATENACCI und Mitarbeiter haben zwei Studien veröffentlicht, in denen die Ergebnisse der IHC für das jeweilige untersuchte Protein schlecht mit den massenspektrometrischen Ergebnissen korrelierten. (CATENACCI et al., 2014; 2015) Des Weiteren erwähnen HEWITT und Mitarbeiter (2008), dass sich die Aussagen über die Validierungen von Biomarkern meist darauf beschränken, ob die jeweilige Validierung erfolgreich ist oder nicht. Mögliche Ursachen für einen Misserfolg werden hingegen selten erforscht. Darüber hinaus nennen sie mögliche Hürden bei der Validierung von mittels nicht auf den Einsatz von Antikörpern basierenden Methoden wie der Massenspektrometrie erforschten Biomarkern durch Methoden, die Antikörper verwenden, wie beispielsweise die IHC. Neben der Verfügbarkeit eines geeigneten Antikörpers, spielen hierbei die zwischen den Methoden unterschiedliche Kinetik, die beim Einsatz eines Antikörpers zum Beispiel durch dessen Affinität und das eingesetzte Detektionssystem bestimmt werde, eine Rolle. Speziell für die IHC käme ein Wechsel von einer rein quantitativen Messung an einem Lysat zur Beurteilung am intakten Gewebe hinzu. Der Vorteil einer genauen Lokalisierbarkeit der Expression im Gewebe und zellulärem Kompartiment gehe hierbei mit dem Verlust der absoluten Quantifizierbarkeit einher. Demnach kommen als Auslöser für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse und der IHC bei einem Teil der Proteine nicht nur ein falsches Ergebnis für eine der bei-

den Methoden, sondern auch die unterschiedliche Art des Proteinnachweises in Frage. Die verschiedenen, möglichen Ursachen werden im Folgenden genauer diskutiert.

Bei der Identifizierung von Peptiden in den Massenspektren wird mit Wahrscheinlichkeiten gearbeitet. Somit kann es auch vorkommen, dass ein Peptid falsch identifiziert wird. Durch den Einsatz eines Orbitrap-Massenspektrometers bei der Probenvermessung und der gut etablierten und weit verbreiteten Software MaxQuant zur Datenanalyse kann davon ausgegangen werden, dass eine gute Massengenauigkeit erreicht wurde. (COX & MANN, 2009) Zudem wurde die FDR bei der Auswertung auf 0,01 gesetzt. Eine irrtümliche Quantifizierung bei über 50 % der Proteine aufgrund einer falschen Peptididentifizierung erscheint somit als unwahrscheinlich. Allerdings kann es auch bei erfolgreicher Identifizierung zu Fehlern bei der Quantifizierung kommen. Sowohl die Quantifizierung der massenspektrometrischen Signale als auch die Erzeugung einer Proteinquantifizierung auf der Grundlage der quantifizierten Peptide können hierbei Fehlerquellen darstellen. Prinzipiell kommen auch eine unzureichende Extraktion, vermehrte Verluste bei der Probenaufbereitung, ein unvollständiger Verdau oder unvollständiges Labeln für einzelne Proteine als Ursache für eine möglicherweise falsche Quantifizierung dieser in Frage. Damit sich dies in Form eines fälschlicherweise angenommenen, signifikanten Unterschieds bei der Expression eines Proteins im Gruppenvergleich äußert, müssten allerdings die Proben einer Gruppe stärker davon betroffen sein, als die der anderen. Alle Proben wurden jedoch verblindet und unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit auf die gleiche Weise aufbereitet. Zu berücksichtigen ist in Bezug auf eine möglicherweise falsche Quantifizierungsrate von mehr als 50 %, dass bis auf CD13 ausschließlich signifikant veränderte Proteine für eine Überprüfung mittels IHC ausgewählt wurden. Als Folge dessen ist es denkbar, dass besagte Quote bei diesen vorselektierten Proteinen höher ist, als diese bei der Betrachtung aller, zwischen zwei- und dreitausend Proteine wäre. Demnach lässt sich keine der vorgenannten, möglichen Ursachen nur deshalb ausschließen, weil es unwahrscheinlich erscheint, dass jedes zweite Protein davon betroffen ist.

Für eine Suche nach Indikatoren dafür, wann eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie und denen der IHC zu erwarten ist, liegt es nahe, alle Parameter, die bei der massenspektrometrischen Analyse bewertet wurden, zu betrachten. Diese sind sowohl für die signifikant veränderten Proteine, bei denen sich die Ergebnisse beider Methoden gegenseitig bestätigten als auch für jene, bei denen dies nicht der Fall war, in Tabelle IV-1 (siehe S. 57 f.) bzw. Tabelle IV-2 (siehe S. 77 ff.) zu finden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass das falsche Protein aus einer signifikant angereicherten Proteingruppe für die IHC ausgewählt wurde. Dies liefert allerdings nicht die Erklärung im Falle der hier untersuchten Proteine, da bewusst nur Proteingruppen zur Validierung ausgewählt wurden, die nur ein Protein enthielten. Im Zuge der relativen Quantifizierung können die iBAQ-Werte einen Hinweis auf die absolute Proteinmenge geben. Mit Werten in der Größenordnung von 10^6 bis 10^9 sowohl bei Proteinen mit einer erfolgreichen als auch bei jenen ohne Validierung der Ergebnisse in der IHC ist kein Zusammenhang des Validierungsausgangs zur absoluten Menge des jeweiligen Proteins bei der Vermessung im Massenspektrometer herzustellen. Des Weiteren erwies sich weder eine höhere Anzahl an spezifischen Peptiden noch eine große prozentuale Sequenzabdeckung als vielversprechend für eine erfolgreiche Validierung. Beide waren zum Beispiel bei CNBP2 mit 7-12 Peptiden bzw. 19-35 % größer als die 2-11 Peptide bzw. 2-13 % bei ITGAV. Bei CNBP2 korrelierte das Ergebnis der IHC jedoch nicht mit dem der massenspektrometrischen Analyse, bei ITGAV hingegen sehr stark. Darüber hinaus gibt auch die Höhe des Fc-Werts keine Gewissheit über den Ausgang der Validierung. Den niedrigsten Wert hierbei hatte VCP mit 1,02. Für VCP

korrelierten die Ergebnisse beider Methoden dennoch stark miteinander. Eine erfolgreiche Validierung der massenspektrometrischen Ergebnisse hängt somit nicht von einem dieser Parameter ab.

Neben einer für manche Proteine möglicherweise falschen Quantifizierung bei der massenspektrometrischen Analyse kann ebenfalls das Ergebnis der IHC nicht der tatsächlichen Expression des Proteins entsprechen. So gilt es zu berücksichtigen, dass das aus dem DAB entstehende dunkelbraune Produkt Licht nicht richtig absorbiert, sondern streut. Daher folgt dieses nicht dem vom Lambert-Beerschem Gesetz beschriebenen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Stoffes und dessen Absorption von Licht. (VAN DER LOOS, 2008) Darüber hinaus stellt die IHC keine echte Quantifizierung der Molekülanzahl des Proteins da, sondern eher eine Abschätzung der auf das Zellkompartiment, in dem das Protein exprimiert wird, beschränkten, relativen Häufigkeit. (HEWITT et al., 2008) Dennoch wird die IHC im Allgemeinen und schon seit längerem zur semiquantitativen Untersuchung der Expression von Proteinen genutzt, wie zahlreiche Studien sowie die Entwicklung verschiedener Bewertungssysteme, wie des H-Scores (MCCARTY et al., 1985) oder des Allred-Scores (ALLRED et al., 1993) zeigen. Für eine Quantifizierung in der IHC müssen allerdings einige Faktoren bei der Durchführung der Methode berücksichtigt werden. (TAYLOR & LEVENSON, 2006; WALKER, 2006) Insbesondere für den Einsatz in der Diagnostik wird die Notwendigkeit einer Standardisierung immer wieder betont. (SEIDAL et al., 2001; WALKER, 2006; LEONG et al., 2010) Auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte die beschriebene tagesabhängige Varianz in der Färbeintensität (SEIDAL et al., 2001) beobachtet werden. So bestand ein Unterschied zwischen der Färbeintensität des initial gefärbten Kollektivs und den zusätzlichen Fällen bei den Färbungen von VCP und ITGAV. Durch den Einsatz des Autostainers wurde versucht diese mögliche Fehlerquelle zu umgehen. Hierzu wurde für die einzelnen Antikörper das jeweilige untersuchte Kollektiv stets auf einmal gefärbt. Lediglich das Kollektiv mit den zusätzlichen Fällen für den Vergleich zwischen chrCC und RO war hierfür zu groß. Deshalb wurden die beiden Gruppen dieses Kollektivs gleichmäßig auf zwei, am selben Tag durchgeführte Färbedurchgänge verteilt. Ein weiterer Faktor, der bei der Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen bedeutsam ist, ist eine auf den jeweiligen Antikörper und das Labor abgestimmte Antigendemaskierung. (WALKER, 2006) Um diesen Einfluss zu minimieren wurde ein besonderes Augenmerk auf eine gründliche Antikörperetablierung gelegt. Darüber hinaus bleibt bei immunhistochemischen Färbungen auch immer der verwendete Antikörper als mögliche Fehlerquelle. Um dies weiter zu eruieren, wäre es allerdings nötig einen weiteren Antikörper gegen ein im besten Fall anderes Epitop des Zielproteins einzusetzen. (SEIDAL et al., 2001; WALKER, 2006)

Vergleicht man die Färbeintensitäten der Tumorzellen für die Proteine, bei denen die Ergebnisse der IHC sehr gut mit denen der massenspektrometrischen Analyse korrelierten, mit jenen für die Proteine, bei denen dies nicht der Fall war, so lässt sich ein interessanter Unterschied feststellen. Bei ersteren verteilte sich die ausgewertete Fläche im Mittel auf alle vier Färbeintensitäten, während bei letzteren fast ausschließlich negative und schwach gefärbte Areale vorgefunden wurden. Hierbei war zudem der Mittelwert für die negativen Anteile bei beiden Gruppen meist größer als jener der schwach gefärbten. Eine rein zu schwache Färbung aufgrund eines fehlerhaften Färbeprotokolls konnte allerdings sowohl bei CNDP2 als auch bei SORD und RDH11 durch das angrenzende Normalgewebe ausgeschlossen werden. In diesem zeigten sich für alle drei Färbungen mindestens mäßig zum Teil aber auch stark gefärbte Epithelzellen der Nierentubuli. Infolgedessen könnte eine mögliche Ursache für eine fehlende Bestätigung der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse bei diesen drei Proteinen sein, dass die

IHC zur Detektion eines Unterschieds bei einer insgesamt schwachen Expression dieser durch die Tumorzellen nicht sensitiv genug ist. In diesem Sinne wurde bereits eine Studie publiziert, in der die Quantifizierungsgrenze für ein Protein bei der gezielt auf dieses Protein abgestimmten massenspektrometrischen Analyse niedriger war als in der IHC. (YANG et al., 2014) Diese These wird dadurch unterstützt, dass bei CNDP2 als schwächste Färbung in den Tumorzellen keinerlei Tendenz hinsichtlich einer stärkeren Expression einer der beiden Gruppen zu erkennen ist. Des Weiteren zeigt RDH11, bei der im Vergleich zu CNDP2 und SORD größere Anteile mit schwacher und mäßiger Färbung ermittelt wurden, zumindest bei der Auswertung mit IHC Profiler eine leichte Tendenz in Richtung des aus der Massenspektrometrie zu erwartenden Ergebnisses. Allerdings ist diese in sich etwas widersprüchlich, wie die genaue Betrachtung des Histogramms zeigt. (siehe hierzu Kapitel IV.2.4.3) Außerdem trägt diese Erklärungsmöglichkeit auch nicht dem Widerspruch Rechnung, der sich für SORD ergibt. Während dieses bei der massenspektrometrischen Analyse signifikant mehr in den chRCC quantifiziert wurde, deutete die nicht signifikante Tendenz in der IHC eher auf eine vermehrte Expression bei den RO hin.

Die fehlende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus IHC und massenspektrometrischer Analyse bei einem Teil der untersuchten Proteine bedeutet nicht zwangsläufig, dass die Quantifizierung bei einer der beiden Methoden fehlerhaft war. Neben der im vorherigen Absatz aufgeführten Möglichkeit einer unterschiedlichen Sensitivität, wurde zu Beginn bereits auf die von HEWITT und Mitarbeiter (2008) diskutierten Unterschiede zwischen den beiden Methoden hingewiesen. Ein weiterer Unterschied bei der Quantifizierung im Zuge der massenspektrometrischen Analyse im Vergleich zur IHC ergibt sich aus der verwendeten relativen Quantifizierung. Hierzu wurden die Proben anhand der Proteinkonzentration gemischt. Ein solcher Schritt findet bei der IHC nicht statt. Des Weiteren werden die Proteine bei der massenspektrometrischen Analyse anhand von Peptiden quantifiziert, während die IHC Epitope in, abgesehen von der Formalinfixierung, intakten Proteinen detektiert. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass, selbst wenn sowohl die Peptide als auch alle Epitope richtig quantifiziert wurden, die Ergebnisse nicht unbedingt übereinstimmen müssen. In diesem Sinne würden, um eine mögliche Ursache hierfür zur Veranschaulichung zu nennen, größere Mengen eines falsch gefalteten Proteins durch die Massenspektrometrie gemessen, in der IHC allerdings nicht unbedingt detektiert werden. Daher kann das divergente Prinzip des Proteinnachweises zu einer unterschiedlichen Quantifizierung führen.

1.3 Vergleich zwischen semiquantitativer Evaluation und Auswertung mit IHC Profiler

Die Evaluation immunhistochemischer Reaktionen durch einen Pathologen bietet große Vorteile gegenüber einer computergestützten Auswertung. Durch das räumliche Vorstellungsvermögen können Tumorzellen eindeutig erkannt und vom Tumorstroma unterschieden werden. Um eine vergleichbare Auswertung durch Computerprogramme zu gewährleisten, sind oft langwierige Kalibrierungen dieser nötig. Darüber hinaus ist es einem geübten Pathologen möglich, färbebedingte Artefakte bei der Auswertung zu erkennen und dem entsprechend eine falsche Bewertung der gefärbten Schnitte durch diese zu vermeiden. Eine große Restriktion bei der quantitativen Auswertung von immunhistochemischen Reaktionen durch einen Menschen ist allerdings die damit einhergehende Subjektivität der Ergebnisse. (TAYLOR, 2014) Aus diesem Grund werden hierbei oft zwei unabhängige Evaluationen durch verschiedene Personen durchgeführt. Auch die semiquantitativen Evaluationen in dieser Arbeit wurden fast alle durch eine weitere Person wiederholt. Dabei ergaben sich keine nennenswerten Abweichungen zu den vorgestellten Ergebnissen. Zusätzlich wurden alle Reaktionen mit IHC Profiler ausgewertet.

Eine Auswertung mit IHC Profiler liefert ein detailliertes und vor allem objektives Ergebnis. Allerdings handelt es sich hierbei, insbesondere im angewandten Modus für cytoplasmatische Färbungen, um eine reine Auswertung der Fläche ohne jegliche Berücksichtigung der Histologie. Dies entspricht somit einer massenspektrometrischen Analyse von lysiertem, makrodissektiertem Gewebe, wobei ebenfalls keine Zuordnung zu histologischen Strukturen möglich ist. Daraus folgt, dass weder die massenspektrometrische Analyse noch die Auswertung mit IHC Profiler eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und Tumorstroma gewährleistet. Ferner muss die Anwendung von IHC Profiler bei membranären Färbungen unter Vorbehalt erfolgen, da hierbei immer auch das Zytoplasma mit gewertet wird. Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse der Auswertungen mit IHC Profiler in dieser Arbeit nicht isoliert zu betrachten, sondern sollen als objektives Verfahren die Aussagekraft der semiquantitativen Evaluation erhöhen.

Vor diesem Hintergrund fand ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der beiden zur Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen eingesetzten Verfahren statt. Die Aussagen, die sich aus diesen für die Expression der sieben immunhistochemisch untersuchten Proteine ergaben, korrespondierten in allen Fällen miteinander. Lediglich die Höhe der Signifikanz dieser Aussagen variierte teilweise.

Dem entsprechend korrelierten die bei der Auswertung berechneten Bewertungszahlen für die semiquantitative Evaluation und für IHC Profiler bei CD13, SORD, RDH11 und ITGAV sehr stark und hoch signifikant miteinander. Folglich ergaben sich bei diesen vier Färbungen auch kaum Unterschiede zwischen den beiden Auswertmethoden in Bezug auf eine Korrelation zu den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse. Besonders bedeutsam ist dies für die beiden membranären Färbungen CD13 und ITGAV. Selbst bei den zusätzlichen 73 Fällen zeigten die Bewertungszahlen für ITGAV eine hoch signifikante und fast noch sehr starke Korrelation. Hieraus lässt sich schließen, dass IHC Profiler auch zur Auswertung membranärer Färbungen genutzt werden kann.

Daneben erwies sich auch für VCP sowohl für die 12 initial untersuchten als auch für die 33 zusätzlichen Fälle eine hoch signifikante und starke Korrelation zwischen besagten Bewertungszahlen. Die somit etwas schwächere Korrelation zwischen den beiden Auswertmethoden spiegelt sich in den Vergleichen dieser mit der massenspektrometrischen Analyse wider. Hierbei korrelierten die Ergebnisse der Auswertung mit IHC Profiler signifikanter und stärker mit jenen aus der Massenspektrometrie als die Ergebnisse der semiquantitativen Evaluation. Eine mögliche Rolle könnte dabei die Expression von VCP durch das Tumorstroma spielen. Wie die semiquantitative Evaluation zeigte und bereits in Kapitel V.1.2 diskutiert wurde, basiert der Unterschied zwischen den metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC bei der Expression von VCP nachweislich auf der divergierenden Expression dieses Proteins durch die Tumorzellen. Ein zusätzlicher Unterschied im Tumorstroma kann hierbei allerdings nicht ausgeschlossen werden. Ein solcher könnte erklären, warum die Ergebnisse der beiden Methoden, die das Tumorstroma mit in die Bewertung mit einbeziehen, besser miteinander korrelieren, als dies für die jeweilige Korrelation dieser mit den Ergebnissen der auf die Tumorzellen begrenzten semiquantitativen Evaluation der Fall ist. Da der Schwerpunkt auf dem Proteom der Tumorzellen, als größte Zellpopulation innerhalb renaler Neoplasien, lag, wurden etwaige Unterschiede im Tumorstroma nicht weiter eruiert.

Für CNDP2 korrelierten die Bewertungszahlen aus der semiquantitativen Evaluation und aus der Auswertung mit IHC Profiler nicht signifikant miteinander. Allerdings entsprachen sich beide Methoden im Gesamtergebnis, wonach keine Unterschiede in der Expression von CNDP2 durch die IHC nachweisbar waren. Wie in Kapitel IV.1.4.2 beschrieben, wurden die zur semi-

quantitativen Evaluation herangezogenen Färbeintensitäten für CNDP2 an die schwache Färbung dieses Proteins in den Tumorzellen angepasst. Dies kommt als mögliche Ursache dafür in Betracht, dass für dieses Protein als einziges keine signifikante Korrelation zwischen den beiden für die IHC genutzten Auswertmethoden bestand.

Gleichermaßen stellt die Auswertung der mittels Antikörper gegen LAMP1 gefärbten Schnitte eine Besonderheit dar. Hierbei wurde im Rahmen der semiquantitativen Evaluation das besondere Färbemuster für dieses Protein getrennt von den Bewertungszahlen beurteilt. Dennoch korrelierten diese hoch signifikant und stark im Hinblick auf das kleine Kollektiv bzw. mittelmäßig bei den zusätzlichen Fällen zu den im Rahmen der Auswertung mit IHC Profiler berechneten Bewertungszahlen. Letztere inkludierten auch die meist stärker gefärbten, kleineren Areale der heterogen gefärbten Zellen. Das für LAMP1 beschriebene Färbemuster kann somit nicht erklären, warum die aus den Ergebnissen von IHC Profiler berechneten Bewertungszahlen statt besser mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse, im Gegensatz zu den Bewertungszahlen der semiquantitativen Evaluation, überhaupt nicht mit diesen korrelierten.

Abschließend sei bezüglich des Vergleichs zwischen den beiden für die IHC verwendeten Auswertmethoden betont, dass die exakten Einteilungen in die vier Färbeintensitäten bzw. -grade nicht identisch waren. Am deutlichsten macht sich dies bei der Auswertung der Färbungen von RDH11 bemerkbar. Wie sich aus dem in Kapitel IV.2.4.3 nachzulesenden Vergleich zwischen den Ergebnissen beider Methoden ergibt, resultierte diese unterschiedliche Einteilung bei der Auswertung mit IHC Profiler in einer deutlicheren Gesamtbewertung der immunhistochemischen Färbungen von RDH11 in Relation zur Gesamtbewertung der semiquantitativen Evaluation.

2 Vergleich metastasierender mit nicht metastasierenden ccRCC

2.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Die Auswahl der ccRCC für die massenspektrometrische Analyse war durch die Verfügbarkeit von für die Makrodissektion ausreichend großen, nekrosefreien Tumorarealen ohne größere Blutgefäße und mit möglichst wenig Einblutungen, Entzündungszellinfiltrationen und Fibrosen limitiert. Zudem schränkte die sehr spezifische Fragestellung die Anzahl verfügbarer Fälle zusätzlich ein. Hiervon waren insbesondere die Fälle für die Gruppe ohne Metastasen betroffen, da für diese eine klinische Verlaufskontrolle von mindestens zweieinhalb Jahren vorausgesetzt wurde. Die Wahl dieses Zeitraums basierte auf den Angaben zur beobachteten Dauer bis zum Auftreten von Rezidiven bei initial Metastasen freien Nierenzellkarzinomen. Für die hier untersuchten T3 klassifizierten Nierenzellkarzinome liegt diese je nach Studie im Mittel bzw. Median bei 12 bis 22 Monaten. (SANDOCK et al., 1995; LEVY et al., 1998; LJUNGBERG et al., 1999; STEPHENSON et al., 2004) Die Wahl einer tumorfreien Verlaufskontrolle von mindestens 30 Monaten liegt darüber hinaus über den 24 Monaten, die bei einer aktuellen Studie aus Schweden als mittlere Dauer bis zum Auftreten von Rezidiven unabhängig von der T Klassifizierung des Primärtumors beobachtet wurde. (DABESTANI et al., 2016) Des Weiteren treten mit 80-85 % die meisten Rezidive innerhalb der ersten drei Jahre auf. (SANDOCK et al., 1995; LJUNGBERG et al., 1999)

Während für alle Fälle eine T3a Klassifizierung gewährleistet werden konnte, unterschieden sich die Vergleichsgruppen insbesondere aufgrund der hohen Anforderungen an die Gruppe der ccRCC ohne Metastasen nicht nur gemäß der Fragestellung in ihrem Metastasierungsstadium,

sondern auch in weiteren Faktoren. Vor allem in Bezug auf die Graduierung, für die eine prognostische Relevanz bei ccRCC publiziert ist (DELAHUNT, 2009; DELAHUNT et al., 2011), wäre eine Übereinstimmung zwischen beiden Gruppen wünschenswert gewesen. Zwar beschränkten sich beide Gruppen des ursprünglichen Kollektivs auf die Grade 2 und 3 nach ISUP, die ccRCC ohne Metastasen verteilten sich jedoch auf beide Grade gleichmäßig, während die ccRCC mit Metastasen alle G3 graduiert wurden. Darüber hinaus unterschieden sich beide Gruppen im Geschlechterverhältnis und im Altersdurchschnitt. Aufgrund der Verfügbarkeit der Daten aus einer langen klinischen Verlaufskontrolle und der einheitlichen T Klassifizierung wurde das Kollektiv dennoch als gut genug bewertet, um metastasierende und nicht metastasierende ccRCC miteinander zu vergleichen. Ein Einfluss der anderen Unterschiede auf die Ergebnisse wird bei der Diskussion dieser berücksichtigt.

Etwas ausgeglichener, dennoch nicht ganz ausgeglichen war die Zusammenstellung des erweiterten Kollektivs hinsichtlich des Differenzierungsgrads, des Geschlechterverhältnisses und des Altersdurchschnitts. Beide Gruppen des erweiterten Kollektivs beinhalteten einen gut differenzierten Fall, wobei die Mehrzahl der Fälle bei beiden Gruppen G2 nach ISUP graduiert wurde. Allerdings war mit 7 zu 1 auch hier der Anteil der Fälle mit einer G3 Differenzierung nach ISUP bei den ccRCC mit Metastasen höher als bei denen ohne Metastasen. Das Geschlechterverhältnis war bei beiden Gruppen des erweiterten Kollektivs zugunsten einer höheren Männerrate nicht ausgewogen. Für die ccRCC ohne Metastasen entsprach das Geschlechterverhältnis von elfmal männlich zu viermal weiblich in Annäherung dem nach der Epidemiologie für Nierenzellkarzinome zu erwartenden Verhältnis von zwei zu eins (MOCH et al., 2016). Bei der Gruppe mit Metastasen war der Männeranteil hingegen noch größer. Zusätzlich unterschieden sich die beiden Gruppen des erweiterten Kollektivs in der Seite der betroffenen Niere. Während bei den Fällen ohne Metastase häufiger die linke Niere betroffen war, waren die ccRCC mit Metastasen öfters in der rechten zu finden.

2.2 Unterschiede im Proteom

Die Anzahl an zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen war mit zehn Proteinen zum Signifikanzniveau von 0,01 des gemäßigten p-Wertes im Limma bzw. drei Proteinen im SAM verhältnismäßig klein. Selbst mit einer nicht ganz so strengen Grenze von 0,05 für den gemäßigten p-Wert im Limma, ließen sich lediglich 55 Proteine als zwischen den Vergleichsgruppen signifikant unterschiedlich exprimiert ermitteln. Infolgedessen entsprach die so erhaltene Liste unterschiedlich exprimierter Proteine sogar bei Aufweichung des Signifikanzniveaus immer noch nicht der von HUANG und Mitarbeiter (2009) für eine Analyse mit DAVID empfohlenen Mindestgröße von 100 Proteinen.

Im Weiteren ergab die anschließende funktionelle Analyse dieser Liste nur für zwei biologische Motive eine signifikante Anreicherung mit einem p-Wert nach Benjamini-Korrektur unter 0,05. Beide waren unter den Proteinen, die in der Gruppe ohne Metastasen vermehrt exprimiert wurden, angereichert. Es handelte sich hierbei zum einen um Proteine der Mitochondrienmembran, die als Zellkompartiment zusammen mit den Vorgängen Oxidation und Reduktion und Elektronentransport durch DAVID zu einer Gruppe zusammen gefasst wurde und zum anderen um den Aminosäurenmetabolismus von Glycin, Serin, Threonin, Arginin und Prolin.

Korrespondierend zu dieser geringeren Expression von Proteinen der Atmungskette bei den ccRCC mit Metastase wurde eine mögliche Beteiligung einer Fehlfunktion der Mitochondrien bei der ossären Metastasierung von Nierenzellkarzinomen vor kurzem in einer Studie beobachtet. Dort wurden Unterschiede im Proteom von zwei Nierenzellkarzinomzelllinien un-

tersucht, die sich in ihrem Potenzial zur Bildung von Knochenmetastasen in Mäusen unterschieden. (WANG et al., 2015) Diese Beobachtung steht im Zusammenhang mit einem schon lange bekannten, veränderten Energiemetabolismus von Tumorzellen. Da dieser zuerst von WARBURG (1956) beschrieben wurde, wird dieses Phänomen auch als Warburg-Effekt bezeichnet. Er beinhaltet eine Verlagerung der Energiegewinnung von der durch nicht neoplastische Zellen überwiegend genutzten oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran hin zur verstärkten anaeroben Glykolyse mit Laktatbildung in den Tumorzellen, wobei dies selbst bei ausreichend verfügbarem Sauerstoff beobachtet wurde. Im Vergleich zu nicht neoplastischem Nierengewebe wurden entsprechende, den Energiestoffwechsel betreffende Veränderungen im Proteom schon mehrfach bei Nierenzellkarzinomen konstatiert und umfassten hierbei zum Teil ebenfalls den Aminosäuremetabolismus. (UNWIN et al., 2003; PERROUD et al., 2006; OPPENHEIMER et al., 2010; VALERA et al., 2010; ATRI et al., 2014; WHITE et al., 2014; ZHAO et al., 2015) Zusätzlich wurden Veränderungen der Expression von Proteinen des Energiemetabolismus bei ccRCC in Abhängigkeit von der Prognose publiziert. (LEBDAL et al., 2015) Dort umfasste die Gruppe mit der schlechtesten Prognose als einzige ccRCC, die bereits Fernmetastasen gebildet hatten. Die Entdeckung, dass dieser Wechsel im Metabolismus mit dem Auftreten einer Metastasierung zunimmt, geht konform mit einer Hypothese, die auf der Grundlage von Zellversuchen an Fibroblasten statuiert wurde. Demnach stellt der höhere Laktatgehalt eine Möglichkeit der Tumorzellen zur Rekrutierung von Fibroblasten dar, die durch eine verstärkte Hyaluronsäuresekretion die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen begünstigen. (STERN et al., 2002)

Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit des Warburg-Effekts und des Aminosäurestoffwechsels von der Graduierung des ccRCC nach Fuhrman beschrieben. (PERROUD et al., 2009) Während sich diese Beobachtungen initial auf proteomische Daten beschränkten, konnten sie später auch durch eine gemeinsame Auswertung dieser Daten mit den Ergebnissen einer metabolischen Analyse unterstützt werden. (WETTERSTEN et al., 2015) Alle zwölf im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit massenspektrometrisch analysierten ccRCC wurden nach Fuhrman G2 oder G3 graduiert. Das Verhältnis zwischen G2 zu G3 lag hierbei für die Gruppe ohne Metastasen bei vier zu zwei und bei den ccRCC mit Metastasen bei drei zu drei. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die ermittelten Unterschiede zwischen den Proteomen der metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC lediglich auf eine differente Gruppenzusammensetzung hinsichtlich der Graduierung zurückzuführen sind. Hingegen fehlt eine Charakterisierung der von PERROUD und Mitarbeiter sowie WETTERSTEN und Mitarbeiter eingesetzten Kollektive in Bezug auf den Metastasierungsstatus. Daher kann nicht beurteilt werden, in wie weit eine Metastasierung die dort festgestellten Unterschiede beeinflusst haben könnte.

Für die vergleichende massenspektrometrische Analyse der klarzelligen Nierenzellkarzinome lässt sich resümieren, dass bei einem unterschiedlichen Metastasierungsstatus nur sehr wenige signifikante Unterschiede im Proteom detektiert werden konnten. Die Ergebnisse der Literaturrecherche zu den wenigen signifikant angereicherten biologischen Motiven bekräftigen jedoch die hohe Validität der massenspektrometrischen Analyse.

2.3 Expression von Valosin-enthaltendem Protein

Die einzige Proteingruppe, die mit einer Signifikanz von 0,01 bezüglich des gemäßigten p-Wertes im Limma in der Gruppe mit Metastasen signifikant angereichert war, beinhaltete mit Annexin A11 und A13 zwei Proteine. Dies war ein Grund dafür, dass stattdessen VCP als Vertreter der durch die metastasierenden ccRCC in Relation zu den nicht metastasierenden ccRCC

mehr exprimierten Proteine für eine Validierung mittels IHC ausgewählt wurde. VCP war zwar erst nach Erweiterung des Signifikanzniveaus auf 0,05 signifikant, allerdings kristallisierte es sich bei der Literaturrecherche als interessantes Ziel heraus. (siehe Kapitel II.3) Ein weiterer Aspekt, der für VCP als ein geeignetes Protein für eine weitere Abklärung sprach, war die Tatsache, dass es ein Stellvertreter für mehrere der Proteingruppen ist, die bei der funktionellen Analyse die Anreicherung eines biologischen Motivs bewirkten. Diese nur teilweise und nach Benjamini-Korrektur nicht mehr signifikant angereicherten Motive waren die Reaktion auf ungefaltete Proteine, der zelluläre Proteintransport und -lokalisation, der DNA-Stoffwechsel und -Reparatur, die zelluläre Stressreaktion, die ATPase Aktivität und ATP-Bindung.

Bei der semiquantitativen Evaluation bestätigten die immunhistochemischen Färbungen der zwölf massenspektrometrisch analysierten Fälle mittels Antikörper gegen VCP zwar nicht signifikant aber zumindest tendenziell die stärkere Expression von VCP durch die ccRCC mit Metastasen. Diese Tendenz erwies sich bei der Auswertung mit IHC Profiler als signifikanter Unterschied zu der Gruppe ohne Metastasen.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde die Expression von VCP bei den 33 zusätzlichen ccRCC des erweiterten Kollektivs immunhistochemisch untersucht. Hierbei ergab sich für die beiden Vergleichsgruppen weder bei der semiquantitativen Evaluation noch bei der Auswertung mit IHC Profiler ein signifikanter Unterschied. Eine stärkere Expression von VCP bei ccRCC mit Metastasen im Vergleich zu ccRCC ohne Metastasen konnte somit nicht verifiziert werden.

Interessant ist, dass VCP zu den Proteinen zählte, für die in der bereits in Kapitel V.2.2 erwähnten Studie zu Knochenmetastasen von Nierenzellkarzinomen ein Zusammenhang zur ossären Metastasierung beschrieben wurde. Die Beobachtungen dort sind allerdings etwas kontrovers. In Bezug auf die von WANG und Mitarbeiter verglichenen Zelllinien wurde für die stärker metastasierende Linie sowohl bei der 2D-Gelelektrophorese als auch im Western Blot eine schwächere Expression von VCP ermittelt. Eine Datenbankanalyse ergab hingegen, dass metastasierende Nierenzellkarzinome mehr VCP exprimieren, obgleich eine stärkere Expression von VCP im Primärtumor prognostisch günstiger ist. Im immunhistochemischen Vergleich zeigten Knochenmetastasen eine stärkere Reaktivität für VCP als primäre Nierenzellkarzinome, wobei Angaben zur genauen Durchführung der quantitativen Auswertung der IHC fehlen. (WANG et al., 2015) Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass auch aus dieser Studie keine eindeutige Aussage zur Expression von VCP im Zusammenhang mit einer Metastasierung möglich ist.

Die fehlende Ratifizierung des in der massenspektrometrischen Analyse nur nach Aufweichung des Signifikanzniveaus signifikanten Ergebnisses für VCP aus dem initial untersuchten Kollektiv an einem größeren lässt darauf schließen, dass es sich bei VCP wohl eher um einen Zufallsbefund handelt.

2.4 Expression von unspezifischer cytosolischer Dipeptidase 2

Im Gegensatz zu VCP ist CNBP2 eines der wenigen Proteine, die zu einem Signifikanzniveau von 0,01 für den gemäßigten p-Wert bei der massenspektrometrischen Analyse im Limma signifikant verändert waren. Hierbei wurde eine stärkere Expression bei den ccRCC ohne Metastase nachgewiesen. Im Zusammenhang mit ccRCC wurde eine divergente Expression bereits von PERROUD und Mitarbeiter (2009) festgestellt. Über die auch in anderen Arbeiten beschriebene stärkere Expression von CNBP2 in ccRCC im Vergleich zu nicht neoplastischem Nierengewebe (OKAMURA et al., 2008; WHITE et al., 2014) hinaus, konnte hierbei eine Abhängigkeit von der Graduierung der ccRCC detektiert werden. Demnach nimmt diese Überexpression von Grad 1 bis

hin zu Grad 4 ab, wobei der größte Unterschied zwischen den Graden 2 und 3 festgestellt wurde. Die Einteilung der Grade erfolgte dort nach Fuhrman. Bezüglich der Graduierung nach Fuhrman unterscheiden sich die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit verglichenen Gruppen des initial untersuchten Kollektivs der ccRCC kaum. Alle zwölf massenspektrometrisch analysierten ccRCC wurden nach Fuhrman G2 oder G3 graduiert. Das Verhältnis zwischen G2 zu G3 lag hierbei für die Gruppe ohne Metastasen bei vier zu zwei und bei den ccRCC mit Metastasen bei drei zu drei. Folglich erscheint es unwahrscheinlich, dass die signifikant stärkere Expression von CNDP2 bei der Gruppe mit Metastasen ausschließlich auf dieser geringfügigen Divergenz in der Gruppenzusammenstellung basiert. Daher kann die publizierte Abhängigkeit der Expression von CNDP2 von der Graduierung die beobachteten Unterschiede nicht erklären. Hingegen fehlt eine Charakterisierung des von PERROUD und Mitarbeiter eingesetzten Kollektivs hinsichtlich des Metastasierungsstatus. Daher kann nicht beurteilt werden, in wie weit eine Metastasierung die dort festgestellten Unterschiede beeinflusst haben könnte.

Die im Zuge der massenspektrometrischen Analyse statuierte stärkere Expression von CNDP2 bei den ccRCC ohne Metastasen konnte in der IHC nicht bestätigt werden. Dort ergaben sich für CNDP2 keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse und der IHC wurden bereits in Kapitel V.1.2 diskutiert. Da die tatsächliche Ursache nicht geklärt werden konnte, ist auch die Interpretation dieses divergierenden Ergebnisses schwierig. Die vorliegenden Daten erlauben somit keine eindeutige Aussage in Bezug auf die Expression von CNDP2 in Abhängigkeit von einer Metastasierung bei ccRCC.

2.5 Abschließende Beurteilung

Der Vergleich zwischen dem Proteom klarzelliger Nierenzellkarzinome mit Metastasen und dem Proteom klarzelliger Nierenzellkarzinome, die klinisch metastasenfrei waren, lieferte nur wenige signifikante Unterschiede. Dem entsprechend war eine funktionelle Analyse nur nach Erhöhung der Grenze für signifikante Proteine möglich. Die wenigen signifikant angereicherten biologischen Motive entsprechen jedoch bereits publizierten Daten und bekräftigen somit die Qualität der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse. Insgesamt offenbarte der durchgeführte, quantitative Proteomvergleich nur wenige wesentliche Unterschiede zwischen ccRCC in Abhängigkeit davon, ob eine Metastasierung vorliegt oder nicht.

Des Weiteren war es für die wenigen, zum Signifikanzniveau von 0,01 für den gemäßigten p-Wert, signifikant unterschiedlich exprimierten Einzelproteine zumindest im Falle des daraus ausgewählten CNDP2 nicht möglich, den in der massenspektrometrischen Analyse gezeigten Unterschied in der IHC zu bestätigen.

Die in Frage kommenden Gründe dafür, dass sich das Proteom der verglichenen ccRCC im Rahmen der durchgeführten Analyse nicht deutlicher unterschieden, sind vielfältig:

Zu Beginn stand die Auswahl geeigneter Fälle. Die durch die verfügbare Kapazität des Massenspektrometers auf sechs Fälle pro Gruppe begrenzte Fallzahl könnte hierbei zu gering gewesen sein, um eventuell vorhandene signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachzuweisen. Damit einhergehend stellt sich bei einer kleinen Fallzahl immer die Frage, wie repräsentativ die ausgewählten Fälle sein können. Darüber hinaus sollte die klinische Verlaufskontrolle neben der Bildgebung zum Zeitpunkt der Nephrektomie eine stattgefundene Metastasierung der ccRCC für die Gruppe ohne Metastasen ausschließen. Jedoch ging aus einer aktuellen Literaturrecherche hervor, dass besonders bei Nierenzellkarzinomen späte Metastasen durch bereits wesentlich früher gestreute Primärtumoren auftreten können. (FRIBERG & NYSTRÖM, 2015) Zwar

werden die meisten Rezidive innerhalb der ersten drei Jahre diagnostiziert (SANDOCK et al., 1995; LJUNGBERG et al., 1999), in Einzelfällen betrug die Zeitdauer zwischen der Resektion des Primärtumors und der Diagnose einer Metastase dieses Nierenzellkarzinoms allerdings zehn Jahre oder mehr. (FRIBERG & NYSTRÖM, 2015) Mit hundertprozentiger Sicherheit lässt sich somit nicht gewährleisten, dass die ccRCC der Gruppe ohne Metastasen zum Zeitpunkt der Nephrektomie tatsächlich noch nicht gestreut hatten. Die beschriebene, nicht perfekte Vergleichbarkeit der beiden Gruppen bei den nicht die Metastasierung betreffenden Parametern dürfte bei einem fehlenden Nachweis von deutlichen Unterschieden zwischen den Gruppen hingegen eine untergeordnete Rolle spielen.

Neben der Patientenauswahl stellt auch die Auswahl des Tumorareals einen Faktor da, der das Ergebnis beeinflussen kann. Da nie der gesamte Tumor archiviert wurde, konnte die Analyse nur unter der Annahme erfolgen, dass der eingebettete Anteil repräsentativ für den gesamten Tumor war. Zusätzlich fand eine weitere Selektion aufgrund der verwendeten Methode statt. Ausschließlich für die Makrodissektion ausreichend große Areale konnten für die massenspektrometrische Analyse verwendet werden. Für Nierenzellkarzinome wurde anhand von Untersuchungen des Genoms allerdings eine gewisse Heterogenität innerhalb des Tumors beschrieben. (GERLINGER et al., 2012) Diese wurde auch bei einer proteomischen Studie beobachtet. (JONES et al., 2014) Vor diesem Hintergrund muss die Repräsentativität der verwendeten Tumorareale für den gesamten Tumor hinterfragt werden.

Indessen ist diskussionsbedürftig, inwiefern ein für den Gesamttumor repräsentatives Areal etwaige mit einer Metastasierung im Zusammenhang stehende Veränderungen im Proteom wiedergeben kann. Die klassische Theorie zur Entstehung von Metastasen besteht in der Annahme, dass nur eine kleine Subpopulation von Tumorzellen innerhalb des Tumors zur Metastasierung befähigt ist. (POSTE & FIDLER, 1980; HUNTER et al., 2003) Demnach könnte es sein, dass zwar ein für die meisten Tumorzellen repräsentatives Areal eingebettet und mit ausgewählt wurde, allerdings ohne die zur Metastasierung befähigten Zellen. Doch selbst wenn die für die Metastasierung verantwortlichen Zellen mit dissektiert wurden, wäre es denkbar, dass die Unterschiede in deren Proteom von dem der übrigen Tumorzellen überschattet wurden. Insgesamt erschließt sich hieraus, dass die publizierte Begrenzung des Potenzials zur Metastasenbildung auf wenige Tumorzellen eine weitere, mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von Unterschieden im Proteom zwischen den metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC darstellt.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich für eines der anderen signifikant veränderten Proteine die unterschiedliche Expression auch immunhistochemisch und an dem erweiterten Kollektiv bestätigen ließe. Der Vorgang der Metastasierung ist hingegen sehr komplex. Damit eine Metastase entstehen kann, muss eine Kaskade an Vorgängen erfolgreich ablaufen. Diese umfasst die Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor, die Invasion in ein Blut- oder Lymphgefäß, das Überleben darin, die Extravasation und Invasion am Ort der Metastasenentstehung, die Proliferation, die Induktion der Neovaskularisation und die Resistenz gegenüber dem Immunsystem. (POSTE & FIDLER, 1980; JIANG et al., 2015) Somit wäre zu erwarten, dass sich die Proteome von ccRCC bei einer Metastasierung in mehr als einem Protein unterscheiden. Diesbezüglich gilt es zu berücksichtigen, dass die massenspektrometrische Analyse nicht das gesamte Proteom der Tumorzellen abdeckte. Das menschliche Genom umfasst mindestens 20 687 proteincodierende Gene. (THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2012) Untersuchungen humaner Zelllinien haben ergeben, dass eine einzelne Zelllinie mindestens 10 000 verschiedene Proteine exprimiert. (BECK et al., 2011; GEIGER et al., 2012) Mit zwei- bis gut dreitausend Proteinen wurden hiervon maximal 20-30 % quantifiziert. Folglich ist es vorstellbar, dass es deutlichere

Unterschiede im Proteom von ccRCC in Abhängigkeit von einer stattgefundenen Metastasierung gibt, die entsprechenden Proteine bei der hier durchgeführten Analyse jedoch nicht quantifiziert wurden.

Ferner beschränkte sich der Proteomvergleich auf eine Quantifizierung der Proteine. Diese muss jedoch nicht zwangsläufig mit der Aktivität dieser korrelieren. (WETTERSTEN et al., 2015) Unterschiede können darüber hinaus zum Beispiel in Form von posttranslationalen Modifikationen bestehen. Beides wurde bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Zusätzlich zu der Frage nach möglichen Gründen für dieses Ergebnis ist von Interesse, in wie weit vergleichbare Studien Unterschiede zwischen den Proteomen von ccRCC in Abhängigkeit von einer Metastasierung entdeckt haben.

Limitiert auf eine ossäre Metastasierung von Nierenzellkarzinomen konnten Unterschiede im Proteom detektiert werden. Hierbei handelte es sich jedoch um Untersuchungen an Zelllinien bzw. den immunhistochemischen Vergleich zwischen Primärtumor und Knochenmetastase. (WANG et al., 2015) Die Ergebnisse dieser Studie sind somit nur bedingt mit dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleich zwischen primären Nierenzellkarzinomen anhand von Patientenproben vergleichbar und wurden bereits in den Kapiteln V.2.2 und V.2.3 genauer beschrieben.

Im Gegensatz dazu basierte die Studie von JONES und Mitarbeiter (2014) ebenfalls auf einen Vergleich primärer ccRCC mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus. Diese waren zwar alle bei der Tumoresektion metastasenfrei, die beiden Gruppen mit je fünf Fällen unterschieden sich jedoch darin, ob später Metastasen diagnostiziert wurden. Während die eine Gruppe über einen Mindestzeitraum von fünf Jahren Rezidiv frei blieb, traten bei den Fällen der anderen Gruppe innerhalb von drei Jahren Metastasen auf. Neben den Tumorproben wurde hierbei auch von den gleichen Patienten stammendes nicht neoplastisches Nierengewebe sowohl proteomisch als auch hinsichtlich der Lipidzusammensetzung massenspektrometrisch untersucht. Dabei ergaben sich für den paarweisen Vergleich zwischen Tumor und Nierengewebe Unterschiede und es konnten potentielle Kandidaten für die Abgrenzung zwischen den beiden Tumorgruppen identifiziert werden. Letztere zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede. Darüber hinaus war eine eindeutige Unterscheidung zwischen den ccRCC, die im Verlauf Metastasen bildeten und jenen die Metastasen frei blieben, ausschließlich anhand der proteomischen Daten ebenfalls nicht möglich.

Während die Studie von JONES und Mitarbeiter mit fünf ccRCC pro Gruppe eine noch geringere Fallzahl als die hier vorgestellte Arbeit umfasste, beruhen die Daten von STEURER und Mitarbeiter (2014) auf der massenspektrometrischen Analyse eines Tissue Microarrays mit 789 Nierenzellkarzinomen. Neben einem Vergleich zwischen klarzelligen, papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen wurden hierbei die 528 analysierten ccRCC nach Unterschieden in ihrem Proteom in Abhängigkeit von deren T Klassifizierung, Graduierung und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen untersucht. Hierbei konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Diese beschränkten sich jedoch auf das Auftreten eines Signals bei einem bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnis ohne Identifizierung oder Quantifizierung des zugrundeliegenden Proteins. Ein Vergleich der Ergebnisse mit der hier vorgestellten Liste an signifikant veränderten Proteinen ist somit nicht möglich. Auch STEURER und Mitarbeiter detektierten mit je sieben Signalen, die je nach T Klassifizierung und Graduierung bzw. zehn Signalen, die in Abhängigkeit von einer Lymphknotenmetastasierung signifikant unterschiedlich häufig gemessen wurden, nur wenige Unterschiede. Allerdings wurden insgesamt nur 25 Signale in den Tumorzellen erkannt.

Gleichwohl eine weitere proteomische Studie ebenfalls auf nur sechs Fällen pro Gruppe basierte, konnten dort interessante Unterschiede festgestellt werden. Die massenspektrometrische Analyse beschränkte sich dort zunächst auf den Vergleich zwischen nicht gepaarten Proben von primären ccRCC und Metastasen von ccRCC. Somit unterschied sie sich von dem hier gewählten Ansatz. Durch hierarchisches Clustern zeigte sich allerdings eine stärkere Ähnlichkeit der Proteome eines Teils der Primärtumoren und denen der Metastasen. Bei Betrachtung der klinischen Daten wurde bemerkt, dass diese Primärtumoren zum Teil im Zusammenhang mit einem Rezidiv standen, während die separat clusternde Gruppe für fünf Jahre Metastasen frei blieb. Darüber hinaus konnte für drei der als signifikant unterschiedlich zwischen Primärtumoren und Metastasen exprimierten Proteine ein Unterschied in der IHC an einem weiteren Kollektiv bestätigt werden. Dieses umfasste zwei Gruppen von primären ccRCC, wobei die Einteilung vom Auftreten einer Metastase innerhalb von drei Jahren bzw. dem Ausbleiben einer Metastasierung für fünf Jahre für die Vergleichsgruppe abhängte. (MASUI et al., 2013) Anhand dieses Kontrollkollektivs war es somit möglich zu zeigen, dass Abweichungen im Proteom zwischen Primärtumor und Metastasen bereits zwischen den Primärtumoren detektiert werden können.

Die Unterschiede, die im Rahmen dieser Arbeit zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden ccRCC beobachtet wurden, waren gering und konnten in dem Fall, in dem es versucht wurde, nicht an weiteren Fällen bestätigt werden. In der Zusammenschau mit anderen Arbeiten wurde deutlich, dass auch diese teilweise nur geringe Unterschiede feststellten. Indessen ist dennoch bemerkenswert, dass alle Arbeiten divergent exprimierte Proteine bei ccRCC in Abhängigkeit von einer synchronen Metastasierung oder eines Rezidivs detektierten. Darüber hinaus stellt die beobachtete unterschiedliche Expression der Proteine der Atmungskette ein mehrfach beobachtetes Motiv dar. In der Folge kann angenommen werden, dass sich das Potential zur Metastasierung bereits im Proteom des gesamten Primärtumors widerspiegelt. Dem entsprechen auch Studien zum Genom metastasierender und nicht metastasierender ccRCC (JONES et al., 2005) und anderer primärer solider Tumoren (RAMASWAMY et al., 2003). Dies muss nicht heißen, dass alle Zellen des Primärtumors potentiell metastasieren können, sondern kann auch bedeuten, dass die Zellen dieser Primärtumoren ein größeres Potential haben diese Fähigkeit zu entwickeln. (FIDLER & KRIPKE, 2003; HUNTER et al., 2003) Aus den bereits diskutierten Gründen, wie der Heterogenität innerhalb eines Tumors, der unvollständigen Proteomabdeckung und der vermuteten Vielzahl an beteiligten Proteinen sind jedoch weitere Studien mit deutlich größeren Fallzahlen zur Abklärung nötig.

3 Vergleich zwischen chRCC und RO

3.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Bei der Auswahl der Fälle für das ursprüngliche, massenspektrometrisch analysierte Kollektiv war eine Vergleichbarkeit der Gruppen insbesondere aufgrund der geringen Fallzahl von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden hierbei sowohl für die chRCC als auch für die RO nur auf die Niere begrenzte Neoplasien, die kleiner als 7 cm waren, ausgewählt. Ferner wurden multipel auftretende RO ausgeschlossen. Für den Vergleich mit einer benignen Neoplasie beinhaltete die Gruppe der chRCC nur solche Tumoren, für die weder eine Metastasierung noch eine Venen-, Lymphgefäß- oder perineurale Invasion bekannt war. Darüber hinaus wurde auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis bei beiden Gruppen geachtet. Lediglich eine vergleichbare Altersstruktur konnte nicht gewährleistet werden.

Um mit dem erweiterten Kollektiv nicht nur die Ergebnisse bestätigen, sondern auch verallgemeinern zu können, war die Auswahl der Fälle für dieses Kollektiv nicht ganz so stringent. Dieses umfasste daher sowohl RO als auch chRCC die größer als 7 cm waren. In Bezug auf die RO, wurden zusätzlich multipel auftretende Fälle mit aufgenommen. Unter den chRCC war darüber hinaus ein Fall, der eine mikroskopische Veneninvasion zeigte. Des Weiteren war die Auswahl der Fälle für dieses ausschließlich mittels IHC untersuchte Kollektiv im Gegensatz zu dem ursprünglichen nicht durch die Verfügbarkeit von für die Makrodissektion ausreichend großem Tumorgewebe restringiert.

3.2 Unterschiede im Proteom

Der proteomische Vergleich zwischen chRCC und RO lieferte mit 104 Proteingruppen, die zwischen den beiden Gruppen bei einem Signifikanzniveau von 0,01 für den gemäßigten p-Wert im Limma signifikant unterschiedlich exprimiert waren, im Vergleich zu der Analyse der ccRCC wesentlich mehr und deutlichere Unterschiede. Unter diesen Proteinen ließen sich bei der funktionellen Analyse selbst nach Benjamini-Korrektur hoch signifikant angereicherte, biologische Motive nachweisen.

Am deutlichsten war die Anreicherung bei den RO. Dort waren über drei Viertel der im Vergleich zu den chRCC signifikant mehr exprimierten Proteine mitochondrial. Im Weiteren konnte für alle bei den RO angereicherten biologischen Motive ein Zusammenhang zu den Mitochondrien hergestellt werden. Die Benennung der Onkozytome basierte ursprünglich auf dem „geschwollenen“ Erscheinungsbild der Onkozyten in der Histologie. Wie sich später durch die Elektronenmikroskopie herausstellte, verbirgt sich hinter dem eosinophilen granulären Charakter der Onkozyten eine Ansammlung von Mitochondrien. Diese machen bei Onkozyten etwa 30-60 % des Zytoplasmavolumens aus. (TALLINI, 1998) Eine stärkere Expression mitochondrialer Proteine bei den RO im Vergleich zu den chRCC stellt somit keine neue Erkenntnis da. Gleichzeitig konstatiert dieses Ergebnis jedoch die hohe Validität der Analyse.

Äquivalent sind die Ergebnisse im Verhältnis zu jenen von YUSENKO und Mitarbeiter (2010) zu bewerten. Deren Studie beinhaltete den Vergleich der Expression mitochondrialer Proteine von RO und chRCC jeweils zu nicht neoplastischem Nierengewebe. Hierzu wurden vor der proteomischen Analyse die Mitochondrien aus den verschiedenen Gewebeproben isoliert. Das Ergebnis umfasste unter anderem eine stärkere Expression von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 5A und 5B, ATP-Synthase Untereinheit D, Thioredoxin-abhängige Peroxidreduktase und Pyruvatdehydrogenase E1 Komponente Untereinheit beta bei den RO im Vergleich zum nicht neoplastischen Nierengewebe. Diese Proteine waren hingegen nicht bei dem Vergleich der chRCC mit dem nicht neoplastischen Nierengewebe vermehrt exprimiert. Infolgedessen bestätigt dieses Ergebnis die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit für diese Proteine ermittelte signifikant stärkere Expression bei den RO im Vergleich zu den chRCC (siehe Tabelle IV-2, Seite 77).

Nicht ganz so deutlich, aber ebenfalls nach Benjamini-Korrektur hoch signifikant, zeigte sich bei den chRCC unter den dort signifikant mehr exprimierten Proteinen eine Anreicherung lysosomaler und endosomaler Proteine. Zusätzlich waren Ras GTPasen insbesondere vom Rab-Typ überrepräsentiert.

Ein vergleichsweise höherer Gehalt an lysosomalen und endosomalen Proteinen bei den chRCC bzw. ein niedriger Gehalt dieser bei den RO stellt hierbei ein sehr interessantes Ergebnis dar. Es untermauert auf proteomischer Ebene die Erkenntnisse und Theorien die erst vor kurzem durch JOSHI und Mitarbeiter (2015) zur Pathogenese der renalen Onkozytome publiziert

wurden. Diese basierten zunächst auf Exom- und Transkriptomsequenzierungen und wurden durch umfangreiche Versuche näher eruiert. Demnach weisen RO, wie bereits in mehreren Studien festgestellt wurde, eine Vielzahl an Mutationen in nukleären und mitochondrialen Genen auf, die Proteine der Atmungskette codieren. Insbesondere Proteine, die Bestandteil des Komplex I der Atmungskette sind, sind hiervon häufig betroffen. Inwieweit diese Mutationen Ursache oder Folge der Tumorgenese sind, konnte auch die aktuelle Studie von JOSHI und Mitarbeiter nicht klären. Allerdings wird schon länger angenommen, dass diese die ordnungsgemäße Funktion der Atmungskette blockieren. Eine Folge ist die Ansammlung der Mitochondrien in den Onkozyten, was bisher meist als kompensatorischer Effekt gewertet wurde (GASPARRE et al., 2011). JOSHI und Mitarbeiter favorisieren in ihrer Studie eine Hemmung der Mitophagie, also des Abbaus der defekten Mitochondrien, als Ursache für deren Ansammlung, ohne hierbei das Zusammenwirken beider Ursachen auszuschließen. JOSHI und Mitarbeiter beobachteten eine Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und des Tumorsuppressorproteins Tp53 (p53) sowie eine Deaktivierung des mammalian target of rapamycin (mTOR) bei den RO und schlussfolgerten hieraus, dass die Defekte in der Atmungskette zu einem permanenten metabolischen Stress innerhalb der Onkozyten führt. Eine Folge der Aktivierung der Regelmechanismen des metabolischen Stresses ist die Zerlegung des Golgi-Apparats. Normalerweise soll hierdurch über die Reduzierung von Transport und Sekretion vorübergehend Energie gespart werden. Damit einhergehen ein geminderter Transport und eine fehlerhafte Funktion der Lysosomen, die für die Mitophagie benötigt werden. Diese Theorie konnte durch umfangreiche Beobachtungen erhärtet werden. So zeigten die renalen Onkozytome zwar einen erhöhten Gehalt an Proteinen, die die Mitophagie initiieren, ein geringerer Gehalt an Markern für Autophagosomen und eine Erhöhung von Markern autophagiedefizienter Zellen sprechen jedoch dafür, dass diese nicht ausgeführt wird. Zusätzlich war eine Reproduktion dieses Effekts in der Zellkultur möglich. Dort bewirkte Metformin, ein Inhibitor des Komplex I der Atmungskette, ebenfalls eine Aktivierung von AMPK, die Zerlegung des Golgi-Apparats und verminderte die Autophagie. JOSHI und Mitarbeiter verglichen darüber hinaus ihre Ergebnisse mit eigenen Daten und publizierten Daten zu chRCC. Ähnliche Veränderungen im Genom dieser und dem eines Teils der Onkozytome führten hierbei zu der Vermutung, dass eosinophile chRCC aus einem, der zwei genetischen Typen der Onkozytome entstehen könnten. Die chRCC zeigen ebenfalls Mutationen in der mitochondrialen DNA. Diese weisen bei den chRCC im Gegensatz zu den RO nur selten eine Homoplasmie auf. Darüber hinaus treten bei den chRCC häufig Mutationen in dem für p53 sowie in dem für Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) codierenden Gen auf. Während die Heteroplasmie die Defekte der Atmungskette kompensieren kann, führen die Mutationen in p53 und PTEN dazu, dass AMPK nicht aktiviert wird. Beide Mechanismen können dazu führen, dass die chRCC die metabolische Stressreaktion überwinden, die Integrität des Golgi-Apparates wiederherstellen und eine ausreichende Mitophagie gewährleisten können. Die anhaltende metabolische Stressreaktion stellt somit eine Barriere für die Tumorgenese dar und bedingt die Benignität der RO im Gegensatz zu den chRCC. (JOSHI et al., 2015) Die schwächere Expression lysosomaler Proteine bei den RO, die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit festgestellt wurde, unterstützt somit die von JOSHI und Mitarbeiter aufgestellte Theorie, dass die Mitophagie bei den RO reduziert ist.

In diesen Kontext passt auch die schwächere Expression der Ras GTPasen bei den RO, da vor allem die bei den chRCC stärker angereicherten Ras GTPasen vom Rab-Typ dem Vesikeltransport dienen. Sie spielen somit unter anderem eine Rolle für die Funktionalität des Golgi-Apparats, der Lysosomen und der Autophagie. (SCHWARTZ et al., 2007; STENMARK, 2009) Zu-

sätzlich wurde eine Bedeutung dieser den Vesikeltransport regulierenden Proteine für die Carcinogenese diskutiert. (GOLDENRING, 2013)

Generell spielen Ras GTPasen häufig eine Rolle in der Tumorgenese und werden mit einer schlechten Prognose assoziiert (WHITE, 2013), was zu einer stärkeren Expression bei den chRCC im Verhältnis zu den RO passt. Eine Übersicht über die vielfältigen Auswirkungen dieser Proteine auf den Metabolismus von Ras-gesteuerten Tumoren wurde von WHITE (2013) zusammengetragen. Unter anderem induzieren sie die Autophagie. Diese ist essentiell zur Aufrechterhaltung eines Reservoirs an funktionellen Mitochondrien und bedient durch die Regeneration von Biomolekülen den erhöhten Nährstoffbedarf der Tumorzellen. Folglich begünstigt die Autophagie auch bei Ras-gesteuerten Tumoren eine höhere Malignität. (WHITE, 2013) Somit steht die höhere Expression der Ras GTPasen ebenfalls im Zusammenhang mit der Überlegenheit der chRCC im Vergleich zu den RO in Bezug auf die Autophagie und stellt ein Faktor für deren maligneres Verhalten dar.

Zusammenfassend zeigten sich somit deutliche Unterschiede zwischen den Proteomen von chRCC und RO, die in Zusammenschau mit einer aktuellen Publikation deren unterschiedliche Dignität mit erklären können.

3.3 Expression von Lysosom-assoziierten Membranprotein 1

Ein Vertreter der laut massenspektrometrischer Analyse signifikant mehr durch die chRCC exprimierten, lysosomalen Proteine ist der Marker für Lysosomen LAMP1.

Zur weiteren Abklärung erfolgten immunhistochemische Färbungen der je sechs massenspektrometrisch untersuchten chRCC und RO mittels Antikörper gegen LAMP1. Hierbei viel zunächst ein innerhalb mancher Zellen auftretendes heterogenes Färbemuster auf. Die semiquantitative Evaluation bestätigte nicht nur signifikant die vermehrte Expression von LAMP1 durch die chRCC, sondern ergab zusätzlich, dass heterogen gefärbte Zellen bei den RO signifikant häufiger auftraten als bei den chRCC. Hieraus folgt, dass die chRCC überwiegend eine diffuse Verteilung von LAMP1 innerhalb der Zelle zeigen, während sich dieses bei den RO meist punktuell anhäuft. Dieses Färbemuster stimmt mit den Ergebnissen der bereits in Kapitel V.3.2 vorgestellten Studie von JOSHI und Mitarbeiter (2015) überein. Demnach kommt es durch die Zerlegung des Golgi-Apparats zur Colokalisation lysosomaler Proteine mit diesem. Dies führt zu einer punktuellen Anhäufung anstelle der sonst diffusen, intracytoplasmatischen Verteilung. Ein vergleichbares Muster wurde von JOSHI und Mitarbeiter für das Lysosom-assoziierte Membranprotein 2 (LAMP2) bei RO beschrieben. Daneben wurde in einer anderen Studie für CD63 geschildert, dass dieses die Tumorzellen der RO in der Immunhistochemie apikal und/oder polar färbt, während die chRCC eine diffuse Reaktivität zeigen. CD63 ist wie LAMP1 und LAMP2 ein membranäres Glykoprotein, das in den Lysosomen vorkommt. (METE et al., 2005) Die Autoren, die dieses Protein zusammen mit drei weiteren auf dessen Eignung zur Unterscheidung zwischen chRCC und RO mittels Immunhistochemie untersuchten, empfehlen es dabei als am besten zu diesem Zweck geeignet. Ferner verglichen NG und Mitarbeiter (2016) die Ergebnisse von METE und Mitarbeiter mit denen aus 108 weiteren Studien zu möglichen immunhistochemischen Biomarkern für die Unterscheidung zwischen chRCC und RO. Als Resultat dieser Metaanalyse befürworteten sie die Verwendung von zehn verschiedenen Biomarkern, unter denen auch CD63 vorgeschlagen wird. Die Studie von METE und Mitarbeiter bekräftigt somit die hier vorgestellten Ergebnisse für LAMP1 und unterstreicht dessen Eignung als Biomarker zur Unterscheidung von chRCC und RO.

Es folgte die immunhistochemische Überprüfung der Ergebnisse für LAMP1 an 73 zusätzlichen Fällen. Diese bestätigten das Resultat der semiquantitativen Evaluation mit hoch signifi-

kanten Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen. Ferner präsentierte sich hierbei die bei der Auswertung mit IHC Profiler am kleinen Kollektiv nicht signifikante Tendenz einer vermehrten Expression bei den chrCC in Form eines mindestens signifikanten, zum Teil auch hoch signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Entitäten.

Die IHC verifizierte somit die für LAMP1, als ein Vertreter der lysosomalen Proteine, massenspektrometrisch festgestellte Anreicherung dieses Proteins bei chromophoben Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu renalen Onkozytomen. Darüber hinaus wurde für einen großen Anteil der Tumorzellen eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation dieses Proteins zwischen den beiden Entitäten festgestellt. Diese entspricht den bei Vergleichen von RO und chrCC beschriebenen Beobachtungen für andere lysosomale Glykoproteine.

3.4 Expression von Sorbitol-Dehydrogenase

Im Gegensatz zu den lysosomalen Proteinen war die Anreicherung der im Zusammenhang mit dem Hexose-Metabolismus stehenden Proteine nach Benjamini-Korrektur nicht mehr signifikant. Dennoch wurde mit SORD ein Vertreter dieser für die IHC ausgewählt. SORD gehörte zu den sowohl im Limma als auch im SAM bei den chrCC signifikant vermehrt exprimierten Proteinen.

Die Ergebnisse für SORD aus der sich anschließenden IHC stehen im Widerspruch zu dem deutlichen und signifikanten Ergebnis aus der massenspektrometrischen Analyse. Neben der semiquantitativen Evaluation zeigte die IHC auch bei der Auswertung mit IHC Profiler eine Tendenz zu einer stärkeren Expression von SORD durch die RO im Vergleich zu den chrCC. Diese Tendenz war allerdings nicht signifikant. Wie in Kapitel V.1.2 erörtert, sind die in Frage kommenden Gründe für diesen Widerspruch zahlreich. Ohne genaue Kenntnis über die tatsächliche Ursache für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der verwendeten Methoden lassen sich die vorliegenden Daten im Hinblick auf den Vergleich der Expression von SORD zwischen RO und chrCC nicht bewerten.

3.5 Expression von Retinol-Dehydrogenase 11

Unabhängig von der funktionellen Analyse erfolgte eine genauere Betrachtung der Expression von RDH11 bei den RO und chrCC. Bei der massenspektrometrischen Analyse demonstrieren die chrCC für diese eine sowohl im Limma als auch im SAM signifikant höhere Expression.

Im Anschluss an die massenspektrometrische Analyse wurde die Expression von RDH11 bei RO und chrCC auch immunhistochemisch untersucht. Hierbei ergab sich sowohl für die negativen Flächenanteile als auch für die mäßig gefärbten bei den chrCC ein höherer Mittelwert als für die RO. Da die Tumoren bei den Färbungen von RDH11 keine stark gefärbten Areale zeigten, präsentierten die chrCC somit sowohl mehr helle als auch mehr dunkle Anteile. Dies konnte durch die Pixelverteilungen bei der Auswertung mit IHC Profiler bestätigt werden. Im Weiteren ergab letztere eine leichte Tendenz dahin gehend, dass die dunklen Anteile einen stärkeren Einfluss auf das Gesamtergebnis nehmen als die hellen. Diese Tendenz, die der massenspektrometrisch festgestellten höheren Expression von RDH11 bei den chrCC entsprechen würde, war allerdings nicht signifikant.

Für die Expression von RDH11 lässt sich somit resümieren, dass dieses laut massenspektrometrischer Analyse in Relation zu renalen Onkozytomen stärker von chromophoben Nierenzellkarzinomen exprimiert wird. Dies ließ sich jedoch nicht eindeutig durch eine zweite Methode

bestätigen. Zur weiteren Abklärung wären somit zusätzliche Untersuchungen sinnvoll und interessant.

3.6 Expression von Integrin alpha-V

Zusätzlich zu den mittels Massenspektrometrie bestimmten, bei den chRCC mehr exprimierten Proteinen wurde auch die Liste der Proteine mit einer höheren Expression bei den RO näher betrachtet. Eine weiterführende Untersuchung der angereicherten mitochondrialen Proteine erschien hierbei nicht notwendig, da sich diese, wie in Kapitel V.3.2 dargestellt, leicht anhand der Biologie der Onkozyten erklären lassen. Darüber hinaus beinhaltete die Liste der in Relation zu den chRCC beim RO vermehrt exprimierten Proteine ITGAV. Dessen unterschiedliche Expression zwischen den verglichenen Entitäten war im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse sowohl im Limma als auch im SAM signifikant.

Die sich anschließende Analyse der Expression von ITGAV bei renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen mittels IHC resultierte in einem sehr eindeutigen Ergebnis. Nicht nur für die zwölf initial untersuchten Fälle sondern auch für die zur Überprüfung herangezogenen zusätzlichen 73 Fälle unterschieden sich die chRCC hoch signifikant von den RO. Unabhängig davon, ob die Auswertung semiquantitativ oder mit IHC Profiler erfolgte, lag die hierbei für die RO ermittelte Expression von ITGAV über jener der chRCC.

In der Gesamtheit der für die Expression von ITGAV bei RO und chRCC vorliegenden Ergebnisse kann somit eine eindeutige Anreicherung dieses Proteins bei renalen Onkozytomen in Relation zu chromophoben Nierenzellkarzinomen festgehalten werden.

3.7 Abschließende Beurteilung

Der durchgeführte Vergleich zwischen renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen deckte deutliche Unterschiede zwischen den Proteomen dieser beiden Entitäten auf. Dabei entspricht die stärkere Expression mitochondrialer Proteine bei den RO, dem bereits beschriebenen Mitochondrienreichtum der Onkozyten. Darüber hinaus kam eine Anreicherung lysosomaler und endosomaler Proteine sowie von Ras GTPasen bei den chRCC zum Vorschein. Als Vertreter aus dieser Gruppe konnte für LAMP1 die vermehrte Expression bei den chRCC mittels IHC auch an einem großen Kollektiv bestätigt werden. Zusätzlich wurde hierbei ein Unterschied in der zellulären Lokalisation dieses Proteins zwischen den chRCC und RO deutlich. Überdies stellt die vermehrte Expression von ITGAV durch die RO in Relation zu den chRCC eine neue Erkenntnis da. Diese konnte ebenfalls anhand des großen Kollektivs immunhistochemisch verifiziert werden.

Im Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung, der Suche nach einem geeigneten diagnostischen Marker zur eindeutigen Unterscheidung zwischen RO und chRCC, ergeben sich somit LAMP1 und ITGAV als potentielle Kandidaten. Die massenspektrometrische Analyse beschränkte sich allerdings auf einen quantitativen Vergleich bei von beiden Entitäten exprimierten Proteinen. Dem entsprechend zeigte sich auch in der IHC keine Unterscheidung in positiv und negativ, sondern ein Intensitätsunterschied. Inwiefern dieser Intensitätsunterschied oder die differente zelluläre Lokalisation von LAMP1 für die Diagnostik von Nutzen sein kann, muss daher weiter geprüft werden.

Daneben ergibt sich aus der vergleichsweise höheren Expression von ITGAV bei den RO die Frage, ob diese beiläufig geschieht oder eine Rolle für die Onkogenese dieser Neoplasie spielt. In

diesem Sinne stellt dieses Protein einen spannenden Kandidaten für eine funktionelle Untersuchung dar.

Auf jeden Fall für die Diagnostik interessant ist der deutliche Unterschied zwischen den beiden Entitäten hinsichtlich ihres Proteoms. Mit der ständigen Weiterentwicklung der für die Massenspektrometrie eingesetzten Technik, wird deren Durchsatz beständig größer und deren Anwendung somit günstiger. Folglich wird ein möglicher Einsatz für die routinemäßige Diagnostik greifbarer. Wie realistisch dies ist, zeigt die Veröffentlichung von THEIS und Mitarbeiter (2013). Darin stellen sie die Etablierung einer massenspektrometrischen Analyse für die Subtypisierung von Amyloidosen im Rahmen der klinischen Diagnostik vor. In nicht allzu ferner Zukunft könnte daher eine routinemäßig durchgeführte, massenspektrometrische Analyse zur Unterscheidung zwischen chromophobem Nierenzellkarzinom und renalem Onkozytom anhand deren proteomischen Expressionsprofil eine gute Alternative zur Diagnoseabsicherung durch die IHC sein.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Unter den renalen Neoplasien des Menschen stellen Nierenzellkarzinome die häufigsten Tumoren dar. Der häufigste Subtyp, das klarzellige Nierenzellkarzinom, hat in etwa 20-30 % der Fälle bei Diagnosestellung bereits Metastasen gebildet und bei weiteren etwa 20-30 % der Fälle treten Metastasen zu einem späteren Zeitpunkt auf. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten liegt bei nur 15-20 %. Um deren Überlebenschancen zu steigern, ist ein detailliertes Verständnis der für die Metastasierung verantwortlichen Mechanismen notwendig. Nur so können neue Ansätze für die bislang unzulänglichen Therapiemöglichkeiten entdeckt werden. Darüber hinaus können diagnostische und prognostische Biomarker für eine Metastasierung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen das Patientenmanagement verbessern.

Wesentlich seltener und mit einer deutlich besseren Prognose kommen chromophobe Nierenzellkarzinome vor. Bei der Diagnosestellung stellt eine sichere Abgrenzung dieser malignen Tumoren zu den benignen renalen Onkozytomen oftmals eine besondere Herausforderung dar. Die Gemeinsamkeiten in deren Morphologie, Genom und Expressionsprofil bestimmter Marker lassen auf eine gemeinsame Herkunft dieser beiden Entitäten schließen. Insofern ist ein Vergleich dieser beiden, sich in ihrer Malignität unterscheidenden Neoplasien auch, über das Ziel einer Vereinfachung der Diagnosestellung hinaus, im Hinblick auf deren Pathogenese von Interesse.

Mit dem Ziel potentielle diagnostische und prognostische Biomarker zu identifizieren, erfolgte die Zusammenstellung zwei verschiedener Kollektive. Das erste bestand aus fortgeschrittenen klarzelligen Nierenzellkarzinomen, die in Abhängigkeit von einer aufgetretenen Metastasierung bzw. dem Ausbleiben einer solchen im klinischen Verlauf in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Das zweite Kollektiv umfasste chromophobe Nierenzellkarzinome und renale Onkozytome. Diese beiden Kollektive wurden zunächst durch eine massenspektrometrische Analyse auf zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich exprimierte Proteine geprüft. Hierzu erfolgte die Extraktion des Proteins aus dem mittels Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe, ein enzymatischer Verdau und, für die relative Quantifizierung, eine Markierung der erhaltenen Peptide durch Dimethylierung mit verschiedenen, stabilen Formaldehyd-Isotopen. Die Vermessung der Proben fand nach einer vorgeschalteten Flüssigchromatographie in einem Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometer statt. Unter den unterschiedlich exprimierten Proteinen wurde nach einer Anreicherung biologischer Motive gesucht. Zur weiteren Validierung schlossen sich immunhistochemische Färbungen einiger ausgewählter Proteine an. Diese wurden sowohl semiquantitativ als auch unter Zuhilfenahme einer Auswertsoftware evaluiert. Neben den initial untersuchten Kollektiven, dienten hierbei weitere Fälle der zusätzlichen Verifizierung der Ergebnisse.

Der Vergleich zwischen den Proteomen der klarzelligen Nierenzellkarzinome mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus resultierte in wenigen signifikanten Unterschieden. Unter den in der Gruppe ohne Metastasen stärker exprimierten Proteinen zeigte sich eine Anreicherung von Proteinen der Atmungskette, was für einen schwächeren Warburg-Effekt bei dieser prognostisch günstigeren Gruppe spricht. Eine stärkere Expression von Proteinen durch die Gruppe mit Metastasen war im Allgemeinen weniger signifikant und unter diesen waren keine biologischen Motive signifikant angereichert. Die Wahl für eine weitere Untersuchung mittels Immunhistochemie fiel auf die unspezifische cytosolische Dipeptidase 2 (CNDP2) und auf das Valosin-enthaltende Protein (VCP). Für CNDP2 korrelierten die Ergebnisse aus der massenspek-

trometrischen Analyse und der Immunhistochemie nicht miteinander. Ursachen hierfür können in der unterschiedlichen Natur dieser beiden Methoden liegen. Am initial untersuchten Kollektiv bestätigten die immunhistochemischen Färbungen hingegen die Ergebnisse für VCP. Die stärkere Expression von VCP durch metastasierende klarzellige Nierenzellkarzinome im Vergleich zu nicht metastasierenden ließ sich jedoch nicht an weiteren Fällen reproduzieren. In der Gesamtheit offenbarte die vergleichende Analyse der Proteome klarzelliger Nierenzellkarzinome kaum deutliche Unterschiede zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne Metastasen. Die intratumorale Heterogenität und die vielen Schritte, die für eine Metastasierung notwendig sind, in Kombination mit der unvollständigen Proteomabdeckung bei der hier durchgeführten Analyse können Gründe dafür sein, warum eventuell vorhandene deutlichere Unterschiede nicht detektiert wurden.

Indessen offenbarte der Vergleich zwischen den Proteomen der chromophoben Nierenzellkarzinome und renalen Onkozytome sehr deutliche Unterschiede. Die renalen Onkozytome exprimierten überwiegend mitochondriale Proteine stärker als die chromophoben Nierenzellkarzinome. Dies entspricht dem Mitochondrienreichtum der Onkozyten und bestätigt die hohe Validität der Analyse. Unter den bei chromophoben Nierenzellkarzinomen stärker exprimierten Proteinen zeigte sich eine Anreicherung lysosomaler und endosomaler Proteine, sowie von Ras GTPasen. Aus den signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen wurde das Lysosom-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP1), die Sorbitol-Dehydrogenase (SORD), die Retinol-Dehydrogenase 11 (RDH11) und Integrin alpha-V (ITGAV) zur weiteren Abklärung mittels Immunhistochemie ausgewählt. Bei SORD und RDH11 ließen sich wie bei CNDP2 keine Korrelation zwischen den Ergebnissen aus der Immunhistochemie und denen der massenspektrometrischen Analyse erkennen. Bei LAMP1 bestätigte die Immunhistochemie hingegen nicht nur die stärkere Expression bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen, sondern enthüllte eine zwischen den beiden Entitäten unterschiedliche Verteilung dieses Proteins innerhalb des Zytoplasmas. Für ITGAV, als eines der bei Onkozytomen stärker exprimierten, nicht mitochondrialen Proteine, korrelierten die Ergebnisse aus der Immunhistochemie ebenfalls sehr gut mit denen der massenspektrometrischen Analyse. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse für LAMP1 und ITGAV an einem weiteren Kollektiv mit 73 Fällen validiert werden. Diese beiden Proteine stellen somit potentielle Biomarker zur Unterscheidung von renalen Onkozytomen und chromophoben Nierenzellkarzinomen dar. Inwiefern sie sich tatsächlich zur Diagnostik eignen muss in weiteren Studien zu deren Sensitivität und Spezifität geprüft werden. Ferner sind die eindeutigen proteomischen Expressionsprofile vielversprechend im Hinblick auf eine Diagnoseabsicherung bei einem möglicherweise routinemäßigen Einsatz der Massenspektrometrie in der Zukunft.

VII SUMMARY

Renal cell carcinoma is the most common neoplasm in human kidney. Compared to other urologic malignancies it provokes the highest mortality rate. This is mainly due to the high incidence of metastases. The most frequent subtype, clear cell renal cell carcinoma, presents with metastases at the time of diagnosis in about 20-30 % of the cases. Approximately, in further 20-30 % of the cases metastases appear in recurrence. For patients with metastases the five-year survival is poor with only 15-20 %. To improve the survival rate of these patients a profound understanding of the mechanisms behind metastasis is essential. Thus, new approaches for therapy can be discovered. Furthermore, diagnostic and prognostic markers for metastases in clear cell renal cell carcinoma are necessary to improve patient management.

More rarely but with a clearly better prognosis chromophobe renal cell carcinoma occur. Reliable discrimination between this malignancy and benign renal oncocytoma can sometimes be challenging for pathologists. Common morphology as well as overlaps in their genome and expression habits of immunohistochemical markers led to the assumption that both neoplasms originate from the same non-neoplastic cells. In this respect a comparison of these two neoplasms which differ in their malignity is not only worthwhile to simplify diagnostics, but also to provide insight into their pathogenesis.

With the objective to identify potential diagnostic and prognostic markers two different collectives were set up. The first one consisted of two cohorts of advanced clear cell renal cell carcinomas, which were distinguished by the occurrence of metastases and the absence of metastases during clinical surveillance, respectively. The second collective included chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas. In the first step, these two collectives were investigated separately by mass spectrometric analysis to identify differentially expressed proteins. To do so, extracted proteins from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples were enzymatically digested and labeled using stable isotopic dimethylation for relative quantification. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used to analyze the samples. Differently expressed proteins were queried for enriched biological themes. To further validate the results, certain proteins were studied by immunohistochemistry. Thereby, evaluation was performed semiquantitatively as well as by using software assisted image analysis. Beside the samples of the initially examined collectives, additional cases were investigated to further confirm the results.

The comparison between the proteomes of clear cell renal cell carcinomas with or without metastases revealed few significant differences. Proteins, which exposed higher expression in the group without metastases, evinced an enrichment of proteins of the respiratory chain. This indicates blander Warburg effect in the group with better prognosis. Higher expression of proteins in the metastatic group was generally less significant. In addition these proteins did not exhibit any enrichment of biological motives amongst them. Cytosolic non-specific dipeptidase 2 (CNDP2) and valosin-containing protein (VCP) were chosen for further investigation by immunohistochemistry. In the case of CNDP2 the immunohistochemical results did not correlate with those of mass spectrometric analysis. This might be accounted for by the dissimilar nature of the two methods. However, immunohistochemical staining of the initially examined collective corroborated the results of VCP, albeit the increased expression of VCP by metastatic clear cell renal cell carcinomas in comparison to those without metastases was not reproducible with additional cases. In Summary, the comparative analysis of the proteomes of clear cell renal cell

carcinomas revealed only few major variations between the metastatic and non-metastatic group. However, due to the intratumor heterogeneity and the complexity of metastasis in combination with incomplete proteome coverage of the performed analysis, there might be further major variations that were not detected.

On the contrary the comparison between the proteomes of chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas disclosed a distinct disparity. Proteins which indicated higher expression in renal oncocytomas were mainly mitochondrial. This is in accordance with the high abundance of mitochondria in oncocytes and validates the analysis. Proteins with increased expression in chromophobe renal cell carcinomas exhibited an enrichment of lysosomal and endosomal proteins together with Ras GTPases. From the list of significantly divergently expressed proteins lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1), sorbitol dehydrogenase (SORD), retinol dehydrogenase 11 (RDH11) and integrin alpha-V (ITGAV) were chosen for further immunohistochemical investigations. As in the case of CNDP2, the results from immunohistochemistry and mass spectrometry did not correlate in the case of the two proteins SORD and RDH11. However, immunohistochemistry confirmed the increased expression of LAMP1 for chromophobe renal cell carcinomas. Furthermore a different cytoplasmic distribution of LAMP1 was revealed between the two entities compared. In addition the immunohistochemical results for ITGAV, one of the non-mitochondrial proteins with higher expression in renal oncocytomas, correlated very well with the results of mass spectrometry. Moreover, the results for LAMP1 and ITGAV were validated with another collective consisting of 73 additional cases. Consequently these two proteins are potential markers for discrimination between renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. Further studies regarding their sensitivity and specificity are necessary to approve applicability in diagnostics. In addition, the distinct proteomic fingerprints have the potential to confirm pathologic diagnosis as soon as the usage of mass spectrometry is available as a diagnostic standard routine.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Abràmoff M. D., Magalhaes P. J., Ram S. J. (2004): *Image processing with ImageJ*. Biophotonics International; 11(7): 36-42.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2011): *Molekularbiologie der Zelle* (5. Auflage). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1990 Seiten.

Allred D. C., Clark G. M., Elledge R., Fuqua S. A., Brown R. W., Chamness G. C., Osborne C. K., McGuire W. L. (1993): *Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst; 85(3): 200-206.

Altelaar A. F. M., Frese C. K., Preisinger C., Hennrich M. L., Schram A. W., Timmers H. T. M., Heck A. J. R., Mohammed S. (2013): *Benchmarking stable isotope labeling based quantitative proteomics*. J Proteomics; 88: 14-26.

Amin M. B., Paner G. P., Alvarado-Cabrero I., Young A. N., Stricker H. J., Lyles R. H., Moch H. (2008): *Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases*. Am J Surg Pathol; 32(12): 1822-1834.

Anderson D. J., Le Moigne R., Djakovic S., Kumar B., Rice J., Wong S., Wang J., Yao B., Valle E., Kiss von Soly S., Madriaga A., Soriano F., Menon M. K., Wu Z. Y., Kampmann M., Chen Y., Weissman J. S., Aftab B. T., Yakes F. M., Shawver L., Zhou H. J., Wustrow D., Rolfe M. (2015): *Targeting the AAA ATPase p97 as an approach to treat cancer through disruption of protein homeostasis*. Cancer Cell; 28(5): 653-665.

Atrih A., Mudaliar M. A., Zakikhani P., Lamont D. J., Huang J. T., Bray S. E., Barton G., Fleming S., Nabi G. (2014): *Quantitative proteomics in resected renal cancer tissue for biomarker discovery and profiling*. Br J Cancer; 110(6): 1622-1633.

Baumgärtner W., Gruber A. D. (Hersg.) (2015): *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag, Stuttgart. 472 Seiten.

Beck M., Schmidt A., Malmstroem J., Claassen M., Ori A., Szymborska A., Herzog F., Rinner O., Ellenberg J., Aebersold R. (2011): *The quantitative proteome of a human cell line*. Mol Syst Biol; 7: 549.

Bellia F., Vecchio G., Rizzarelli E. (2014): *Carnosinases, their substrates and diseases*. Molecules; 19(2): 2299-2329.

Belyaeva O. V., Stetsenko A. V., Nelson P., Kedishvili N. Y. (2003): *Properties of short-chain dehydrogenase/reductase RalR1: characterization of purified enzyme, its orientation in the microsomal membrane, and distribution in human tissues and cell lines*. Biochemistry; 42(50): 14838-14845.

Besson D., Pavageau A. H., Valo I., Bourreau A., Bélanger A., Eymerit-Morin C., Moulière A., Chassevent A., Boisdron-Celle M., Morel A., Solassol J., Campone M., Gamelin E., Barré B., Coqueret O., Guette C. (2011): *A quantitative proteomic approach of the different stages of colorectal cancer establishes OLFM4 as a new nonmetastatic tumor marker*. Mol Cell Proteomics; 10(12): M111.009712.

Boenisch T. (Hersg.) (2006): *Handbuch immunchemische Färbemethoden* (3. Auflage): Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA und Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland. 85 Seiten.

Boersema P. J., Aye T. T., van Veen T. A., Heck A. J., Mohammed S. (2008): *Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates*. Proteomics; 8(22): 4624-4632.

Boersema P. J., Raijmakers R., Lemeer S., Mohammed S., Heck A. J. R. (2009): *Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Nat Protoc; 4(4): 484-494.

Bradford M. M. (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem; 72(1): 248-254.

Bryan J. N., Henry C. J., Turnquist S. E., Tyler J. W., Liptak J. M., Rizzo S. A., Sfiligoi G., Steinberg S. J., Smith A. N., Jackson T. (2006): *Primary renal neoplasia of dogs*. J Vet Intern Med; 20(5): 1155-1160.

Bug M., Meyer H. (2012): *Expanding into new markets-VCP/p97 in endocytosis and autophagy*. J Struct Biol; 179(2): 78-82.

Carr I. M., Markham A. F. (1995): *Molecular genetic analysis of the human sorbitol dehydrogenase gene*. Mamm Genome; 6(9): 645-652.

Catenacci D. V., Liao W. L., Thyparambil S., Henderson L., Xu P., Zhao L., Rambo B., Hart J., Xiao S. Y., Bengali K., Uzzell J., Darfler M., Krizman D. B., Cecchi F., Bottaro D. P., Karrison T., Veenstra T. D., Hembrough T., Burrows J. (2014): *Absolute quantitation of Met using mass spectrometry for clinical application: assay precision, stability, and correlation with MET gene amplification in FFPE tumor tissue*. PLoS One; 9(7): e100586.

Catenacci D. V., Liao W. L., Zhao L., Whitcomb E., Henderson L., O'Day E., Xu P., Thyparambil S., Krizman D., Bengali K., Uzzell J., Darfler M., Cecchi F., Blackler A., Bang Y. J., Hart J., Xiao S. Y., Lee S. M., Burrows J., Hembrough T. (2015): *Mass-spectrometry-based quantitation of Her2 in gastroesophageal tumor tissue: comparison to IHC and FISH*. Gastric Cancer.

Chial H. J., Thompson H. B., Splittgerber A. G. (1993): *A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G*. Anal Biochem; 209(2): 258-266.

Choudhary S., Rajesh A., Mayer N. J., Mulcahy K. A., Haroon A. (2009): *Renal oncocytoma: CT features cannot reliably distinguish oncocytoma from other renal neoplasms*. Clin Radiol; 64(5): 517-522.

Chung S. S., Ho E. C., Lam K. S., Chung S. K. (2003): *Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress*. J Am Soc Nephrol; 14(8 Suppl 3): 233-236.

Compton S. J., Jones C. G. (1985): *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem; 151(2): 369-374.

Conroy K. P., Kitto L. J., Henderson N. C. (2016): *AlphaV integrins: key regulators of tissue fibrosis*. Cell Tissue Res; 365(3): 511-519.

Cox J., Mann M. (2008): *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol; 26(12): 1367-1372.

Cox J., Mann M. (2009): *Computational principles of determining and improving mass precision and accuracy for proteome measurements in an Orbitrap*. J Am Soc Mass Spectrom; 20(8): 1477-1485.

Dabestani S., Thorstenson A., Lindblad P., Harmenberg U., Ljungberg B., Lundstam S. (2016): *Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study*. World J Urol; 34(8): 1081-1086.

Dantuma N. P., Acs K., Luijsterburg M. S. (2014): *Should I stay or should I go: VCP/p97-mediated chromatin extraction in the DNA damage response*. Exp Cell Res; 329(1): 9-17.

Davis C. F., Ricketts C. J., Wang M., Yang L., Cherniack A. D., Shen H., Buhay C., Kang H., Kim S. C., Fahey C. C., Hacker K. E., Bhanot G., Gordenin D. A., Chu A., Gunaratne P. H., Biehl M., Seth S., Kaiparettu B. A., Bristow C. A., Donehower L. A., Wallen E. M., Smith A. B., Tickoo S. K., Tamboli P., Reuter V., Schmidt L. S., Hsieh J. J., Choueiri T. K., Hakimi A. A., Chin L., Meyerson M., Kucherlapati R., Park W. Y., Robertson A. G., Laird P. W., Henske E. P., Kwiatkowski D. J., Park P. J., Morgan M., Shuch B., Muzny D., Wheeler D. A., Linehan W. M., Gibbs R. A., Rathmell W. K., Creighton C. J. (2014): *The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma*. Cancer Cell; 26(3): 319-330.

De Franceschi N., Hamidi H., Alanko J., Sahgal P., Ivaska J. (2015): *Integrin traffic - the update*. J Cell Sci; 128(5): 839-852.

de Peralta-Venturina M., Moch H., Amin M., Tamboli P., Hailemariam S., Mihatsch M., Javidan J., Stricker H., Ro J. Y., Amin M. B. (2001): *Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases*. Am J Surg Pathol; 25(3): 275-284.

Delahunt B. (2009): *Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma*. Mod Pathol; 22 Suppl 2: 24-36.

Delahunt B., Sika-Paotonu D., Bethwaite P. B., William Jordan T., Magi-Galluzzi C., Zhou M., Samaratunga H., Srigley J. R. (2011): *Grading of clear cell renal cell carcinoma should be based on nucleolar prominence*. Am J Surg Pathol; 35(8): 1134-1139.

Delahunt B., Cheville J. C., Martignoni G., Humphrey P. A., Magi-Galluzzi C., McKenney J., Egevad L., Algaba F., Moch H., Grignon D. J., Montironi R., Srigley J. R. (2013): *The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters*. Am J Surg Pathol; 37(10): 1490-1504.

Edmondson E. F., Hess A. M., Powers B. E. (2015): *Prognostic significance of histologic features in canine renal cell carcinomas: 70 nephrectomies*. Vet Pathol; 52(2): 260-268.

Eskelinen E. L. (2006): *Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy*. Mol Aspects Med; 27(5-6): 495-502.

Fidler I. J., Kripke M. L. (2003): *Genomic analysis of primary tumors does not address the prevalence of metastatic cells in the population*. Nat Genet; 34(1): 23.

Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S. (1948): *The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups*. J Am Chem Soc; 70(8): 2673-2684.

Friberg S., Nyström A. (2015): *Cancer metastases: early dissemination and late recurrences*. Cancer Growth Metastasis; 8: 43-49.

Friedenauer S., Berlet H. H. (1989): *Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents*. Analytical Biochemistry; 178(2): 263-268.

Fuhrman S. A., Lasky L. C., Limas C. (1982): *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. Am J Surg Pathol; 6(7): 655-663.

Fujita K., Nakamura Y., Oka T., Ito H., Tamura T., Tagawa K., Sasabe T., Katsuta A., Motoki K., Shiwaku H., Sone M., Yoshida C., Katsuno M., Eishi Y., Murata M., Taylor J. P., Wanker E. E., Kono K., Tashiro S., Sobue G., La Spada A. R., Okazawa H. (2013): *A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases*. Nat Commun; 4: 1816.

Gasparre G., Romeo G., Rugolo M., Porcelli A. M. (2011): *Learning from oncocytic tumors: Why choose inefficient mitochondria?* Biochim Biophys Acta; 1807(6): 633-642.

Geiger T., Wehner A., Schaab C., Cox J., Mann M. (2012): *Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins*. Mol Cell Proteomics; 11(3): M111.014050.

Gerlinger M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N. Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C. R., Nohadani M., Eklund A. C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P. A., Swanton C. (2012): *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med; 366(10): 883-892.

Gill J. S., Ghatei M. A., Domin J., Bloom S. R. (1989): *The generation of valosin-like peptides from a precursor protein in vitro as an extraction artifact*. Life Sci; 44(7): 483-491.

Gnarra J. R., Tory K., Weng Y., Schmidt L., Wei M. H., Li H., Latif F., Liu S., Chen F., Duh F. M., Lubensky I., Duan D. R., Florence C., Pozzatti R., Walther M. M., Bander N. H., Grossman H. B., Brauch H., Pomer S., Brooks J. D., Isaacs W. B., Lerman M. I., Zbar B., Linehan W. M. (1994): *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nat Genet; 7(1): 85-90.

Goldenring J. R. (2013): *A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis*. Nat Rev Cancer; 13(11): 813-820.

Guo K., Ji C., Li L. (2007): *Stable-isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples*. Anal Chem; 79(22): 8631-8638.

Gustafsson O. J., Arentz G., Hoffmann P. (2015): *Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue*. Biochim Biophys Acta; 1854(6): 559-580.

Haeseleer F., Jang G. F., Imanishi Y., Driessen C. A., Matsumura M., Nelson P. S., Palczewski K. (2002): *Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina*. J Biol Chem; 277(47): 45537-45546.

Hes O., Michal M., Šíma R., Vaněček T., Brunelli M., Martignoni G., Kuroda N., Cabrero I. A., Perez-Montiel D., Hora M., Úrge T., Dvořák M., Jarošová M., Yang X. (2008): *Renal oncocytoma with and without intravascular extension into the branches of renal vein have the same morphological, immunohistochemical and genetic features*. Virchows Arch; 452(3): 285-293.

Hewitt S. M., Takikita M., Abedi-Ardekani B., Kris Y., Bexfield K., Braunschweig T., Chung J. Y. (2008): *Validation of proteomic-based discovery with tissue microarrays*. Proteomics Clin Appl; 2(10-11): 1460-1466.

Higgins J. P., Shinghal R., Gill H., Reese J. H., Terris M., Cohen R. J., Fero M., Pollack J. R., van de Rijn M., Brooks J. D. (2003): *Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray*. Am J Pathol; 162(3): 925-932.

Hill H. D., Straka J. G. (1988): *Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents*. Anal Biochem; 170(1): 203-208.

Hsu J.-L., Huang S.-Y., Chow N.-H., Chen S.-H. (2003): *Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Anal Chem; 75(24): 6843-6852.

Huang D., W., Sherman B. T., Lempicki R. A. (2009): *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc; 4(1): 44-57.

Hunter K., Welch D. R., Liu E. T. (2003): *Genetic background is an important determinant of metastatic potential*. Nat Genet; 34(1): 23-24.

Jiang W. G., Sanders A. J., Katoh M., Ungefroren H., Gieseler F., Prince M., Thompson S. K., Zollo M., Spano D., Dhawan P., Sliva D., Subbarayan P. R., Sarkar M., Honoki K., Fujii H., Georgakilas A. G., Amedei A., Niccolai E., Amin A., Ashraf S. S., Ye L., Helferich W. G., Yang X., Boosani C. S., Guha G., Ciriolo M. R., Aquilano K., Chen S., Azmi A. S., Keith W. N., Bilsland A., Bhakta D., Halicka D., Nowsheen S., Pantano F., Santini D. (2015): *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. Semin Cancer Biol; 35 Suppl: 244-275.

Jimenez C. R., Verheul H. M. (2014): *Mass spectrometry-based proteomics: from cancer biology to protein biomarkers, drug targets, and clinical applications*. Am Soc Clin Oncol Educ Book: e504-510.

Johnson J. O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., Van Deerlin V. M., Trojanowski J. Q., Gibbs J. R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., Ding J., McCluskey L., Martinez-Lage M., Falcone D., Hernandez D. G., Arepalli S., Chong S., Schymick J. C., Rothstein J., Landi F., Wang Y. D., Calvo A., Mora G., Sabatelli M., Monsurro M. R., Battistini S., Salvi F., Spataro R., Sola P., Borghero G., Galassi G., Scholz S. W., Taylor J. P., Restagno G., Chio A., Traynor B. J. (2010): *Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS*. Neuron; 68(5): 857-864.

Jones E. E., Powers T. W., Neely B. A., Cazares L. H., Troyer D. A., Parker A. S., Drake R. R. (2014): *MALDI imaging mass spectrometry profiling of proteins and lipids in clear cell renal cell carcinoma*. Proteomics; 14(7-8): 924-935.

Jones J., Otu H., Spentzos D., Kolia S., Inan M., Beecken W. D., Fellbaum C., Gu X., Joseph M., Pantuck A. J., Jonas D., Libermann T. A. (2005): *Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer*. Clin Cancer Res; 11(16): 5730-5739.

Joshi S., Tolkunov D., Aviv H., Hakimi A. A., Yao M., Hsieh J. J., Ganesan S., Chan C. S., White E. (2015): *The genomic landscape of renal oncocytoma identifies a metabolic barrier to tumorigenesis*. Cell Rep; 13(9): 1895-1908.

Kaelin W. G., Jr. (2002): *Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome*. Nat Rev Cancer; 2(9): 673-682.

Kedishvili N. Y., Chumakova O. V., Chetyrkin S. V., Belyaeva O. V., Lapshina E. A., Lin D. W., Matsumura M., Nelson P. S. (2002): *Evidence that the human gene for prostate short-chain*

dehydrogenase/reductase (PSDR1) encodes a novel retinal reductase (RalR1). J Biol Chem; 277(32): 28909-28915.

Kobayashi N., Suzuki K., Shibuya H., Sato T., Aoki I., Nagashima Y. (2008): *Renal collecting duct carcinoma in a dog*. Vet Pathol; 45(4): 489-494.

Kobayashi N., Suzuki K., Murakami H., Kagawa E., Aoki I., Nagashima Y. (2010): *Chromophobe renal cell carcinoma with sarcomatoid transformation in a dog*. J Vet Diagn Invest; 22(6): 983-987.

Koller K. J., Brownstein M. J. (1987): *Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin*. Nature; 325(6104): 542-545.

Kummalu T., Inoue T., Miura Y., Narusawa M., Inoue H., Komatsu N., Wanachiwanawin W., Sugiyama D., Tani K. (2015): *Ribosomal protein L11- and retinol dehydrogenase 11-induced erythroid proliferation without erythropoietin in UT-7/Epo erythroleukemic cells*. Exp Hematol; 43(5): 414-423.

Lebdai S., Verhoest G., Parikh H., Jacquet S. F., Bensalah K., Chautard D., Leclercq N. R., Azzouzi A. R., Bigot P. (2015): *Identification and validation of TGFBI as a promising prognosis marker of clear cell renal cell carcinoma*. Urol Oncol; 33(2): 69.e11-69.e18.

Leibovich B. C., Lohse C. M., Crispen P. L., Boorjian S. A., Thompson R. H., Blute M. L., Cheville J. C. (2010): *Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma*. J Urol; 183(4): 1309-1315.

Leitlinienprogramm Onkologie (Hersg.) (2015): *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.0*: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. AWMF-Registernummer: 043/017-OL; 203 Seiten.

Leong T. Y.-M., Cooper K., Leong A. S.-Y. (2010): *Immunohistology-past, present, and future*. Adv Anat Pathol; 17(6): 404-418.

Levy D. A., Slaton J. W., Swanson D. A., Dinney C. P. (1998): *Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma*. J Urol; 159(4): 1163-1167.

Lhor M., Méthot M., Horchani H., Salesse C. (2015): *Structure of the N-terminal segment of human retinol dehydrogenase 11 and its preferential lipid binding using model membranes*. Biochim Biophys Acta; 1848(3): 878-885.

Lichtenfels R., Dressler S. P., Zobawa M., Recktenwald C. V., Ackermann A., Atkins D., Kersten M., Hesse A., Puttkammer M., Lottspeich F., Seliger B. (2009): *Systematic comparative protein expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: a pilot study based on the separation of tissue specimens by two-dimensional gel electrophoresis*. Mol Cell Proteomics; 8(12): 2827-2842.

Licker V., Côte M., Lobrinus J. A., Rodrigo N., Kövari E., Hochstrasser D. F., Turck N., Sanchez J. C., Burkhard P. R. (2012): *Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease*. J Proteomics; 75(15): 4656-4667.

Lillakas K. (2013): *Renal adenoma in a 5-year-old Labrador retriever: big is not always bad*. Can Vet J; 54(2): 179-181.

Lin B., White J. T., Ferguson C., Wang S., Vessella R., Bumgarner R., True L. D., Hood L., Nelson P. S. (2001): *Prostate short-chain dehydrogenase reductase 1 (PSDR1): a new member of the short-*

chain steroid dehydrogenase/reductase family highly expressed in normal and neoplastic prostate epithelium. Cancer Res; 61(4): 1611-1618.

Linehan W. M., Walther M. M., Zbar B. (2003): *The genetic basis of cancer of the kidney.* J Urol; 170(6 Pt 1): 2163-2172.

Linehan W. M., Srinivasan R., Schmidt L. S. (2010): *The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease.* Nat Rev Urol; 7(5): 277-285.

Linehan W. M. (2012): *Genetic basis of kidney cancer: role of genomics for the development of disease-based therapeutics.* Genome Res; 22(11): 2089-2100.

Lium B., Moe L. (1985): *Hereditary multifocal renal cystadenocarcinomas and nodular dermatofibrosis in the German shepherd dog: macroscopic and histopathologic changes.* Vet Pathol; 22(5): 447-455.

Ljungberg B., Alamdari F. I., Rasmuson T., Roos G. (1999): *Follow-up guidelines for nonmetastatic renal cell carcinoma based on the occurrence of metastases after radical nephrectomy.* BJU Int; 84(4): 405-411.

Ljungberg B., Bensalah K., Canfield S., Dabestani S., Hofmann F., Hora M., Kuczyk M. A., Lam T., Marconi L., Merseburger A. S., Mulders P., Powles T., Staehler M., Volpe A., Bex A. (2015): *EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update.* Eur Urol; 67(5): 913-924.

Lorenzi M. (2007): *The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient.* Exp Diabetes Res; 2007: 61038.

Magrane M., Consortium U. (2011): *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data.* Database; 2011.

Masui O., White N. M., DeSouza L. V., Krakovska O., Matta A., Metias S., Khalil B., Romaschin A. D., Honey R. J., Stewart R., Pace K., Bjarnason G. A., Siu K. W., Yousef G. M. (2013): *Quantitative proteomic analysis in metastatic renal cell carcinoma reveals a unique set of proteins with potential prognostic significance.* Mol Cell Proteomics; 12(1): 132-144.

McCarty K. S., Jr., Miller L. S., Cox E. B., Konrath J., McCarty K. S., Sr. (1985): *Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies.* Arch Pathol Lab Med; 109(8): 716-721.

McGavin M. D., Zachary J. F. (2009): *Pathologie der Haustiere - Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie* (1. Auflage). München: Urban & Fischer Verlag, München. 1340 Seiten.

Mete O., Kilicaslan I., Gulluoglu M. G., Uysal V. (2005): *Can renal oncocytoma be differentiated from its renal mimics? The utility of anti-mitochondrial, caveolin 1, CD63 and cytokeratin 14 antibodies in the differential diagnosis.* Virchows Arch; 447(6): 938-946.

Meyer H., Bug M., Bremer S. (2012): *Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system.* Nat Cell Biol; 14(2): 117-123.

Meyer H., Weihl C. C. (2014): *The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis.* J Cell Sci; 127(Pt 18): 3877-3883.

Moch H., Humphrey P. A., Ulbright T. M., Reuter V. E. (Hersg.) (2016): *WHO Classification of tumours of the urinary system and male genital organs* (4. Auflage). In World Health Organization

classification of tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Lyon Cedex, Frankreich. 356 Seiten.

Murphy W. M., Grignon D. J., Perlman E. J. (2004): *Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures*. In AFIP Atlas of tumor pathology, Silverberg S. G. (Hersg.). Washington, DC: American Registry of Pathology. 394 Seiten.

Nalbandian A., Donkervoort S., Dec E., Badadani M., Katheria V., Rana P., Nguyen C., Mukherjee J., Caiozzo V., Martin B., Watts G. D., Vesa J., Smith C., Kimonis V. E. (2011): *The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: inclusion body myopathy with Paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis*. J Mol Neurosci; 45(3): 522-531.

Ng K. L., Morais C., Bernard A., Saunders N., Samaratunga H., Gobe G., Wood S. (2016): *A systematic review and meta-analysis of immunohistochemical biomarkers that differentiate chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma*. J Clin Pathol; 69(8): 661-671.

Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T., Shimojo S., Koori T., Mora M., Riggs J. E., Oh S. J., Koga Y., Sue C. M., Yamamoto A., Murakami N., Shanske S., Byrne E., Bonilla E., Nonaka I., DiMauro S., Hirano M. (2000): *Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)*. Nature; 406(6798): 906-910.

Okamura N., Masuda T., Gotoh A., Shirakawa T., Terao S., Kaneko N., Suganuma K., Watanabe M., Matsubara T., Seto R., Matsumoto J., Kawakami M., Yamamori M., Nakamura T., Yagami T., Sakaeda T., Fujisawa M., Nishimura O., Okumura K. (2008): *Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma*. Proteomics; 8(15): 3194-3203.

Oosterwijk E., Rathmell W. K., Junker K., Brannon A. R., Pouliot F., Finley D. S., Mulders P. F., Kirkali Z., Uemura H., Belldegrun A. (2011): *Basic research in kidney cancer*. Eur Urol; 60(4): 622-633.

Oppenheimer S. R., Mi D., Sanders M. E., Caprioli R. M. (2010): *Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma*. J Proteome Res; 9(5): 2182-2190.

Parker C. E., Borchers C. H. (2014): *Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation-quality assurance and control of protein biomarker assays*. Mol Oncol; 8(4): 840-858.

Patel S., Latterich M. (1998): *The AAA team: related ATPases with diverse functions*. Trends Cell Biol; 8(2): 65-71.

Perroud B., Lee J., Valkova N., Dhirapong A., Lin P. Y., Fiehn O., Kültz D., Weiss R. H. (2006): *Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling*. Mol Cancer; 5: 64.

Perroud B., Ishimaru T., Borowsky A. D., Weiss R. H. (2009): *Grade-dependent proteomics characterization of kidney cancer*. Mol Cell Proteomics; 8(5): 971-985.

Poste G., Fidler I. J. (1980): *The pathogenesis of cancer metastasis*. Nature; 283(5743): 139-146.

Ramaswamy S., Ross K. N., Lander E. S., Golub T. R. (2003): *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nat Genet; 33(1): 49-54.

Rappsilber J., Ishihama Y., Mann M. (2003): *Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics*. Anal Chem; 75(3): 663-670.

Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007): *Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips*. Nat Protoc; 2(8): 1896-1906.

Reuter V. E., Argani P., Zhou M., Delahunt B. (2014): *Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the kidney tumors: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference*. Am J Surg Pathol; 38(8): e35-49.

Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C. W., Shi W., Smyth G. K. (2015): *Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. Nucleic Acids Res; 43(7): e47.

Robert Koch-Institut (Hersg.) (2015): *Krebs in Deutschland 2011/2012* (10. Auflage). In Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert Koch-Institut , Berlin und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Lübeck.

Ruifrok A. C., Johnston D. A. (2001): *Quantification of histochemical staining by color deconvolution*. Anal Quant Cytol Histol; 23(4): 291-299.

Sabattini E., Bisgaard K., Ascani S., Poggi S., Piccioli M., Ceccarelli C., Pieri F., Fraternali-Orcioni G., Pileri S. A. (1998): *The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques*. J Clin Pathol; 51(7): 506-511.

Saeed A. I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J. (2003): *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques; 34(2): 374-378.

Sandock D. S., Seftel A. D., Resnick M. I. (1995): *A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage*. J Urol; 154(1): 28-31.

Schwake M., Schröder B., Saftig P. (2013): *Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology*. Traffic; 14(7): 739-748.

Schwartz S. L., Cao C., Pylypenko O., Rak A., Wandinger-Ness A. (2007): *Rab GTPases at a glance*. J Cell Sci; 120(Pt 22): 3905-3910.

Seidal T., Balaton A. J., Battifora H. (2001): *Interpretation and quantification of immunostains*. Am J Surg Pathol; 25(9): 1204-1207.

Seliger B., Lichtenfels R., Atkins D., Bukur J., Halder T., Kersten M., Harder A., Ackermann A., Malenica B., Brenner W., Zobawa M., Lottspeich F. (2005): *Identification of fatty acid binding proteins as markers associated with the initiation and/or progression of renal cell carcinoma*. Proteomics; 5(10): 2631-2640.

Shaffer J. P. (1995): *Multiple hypothesis testing*. Annu Rev Psychol; 46(1): 561-584.

Shi S. R., Key M. E., Kalra K. L. (1991): *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections*. J Histochem Cytochem; 39(6): 741-748.

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem; 150(1): 76-85.

Smyth G. K. (2004): *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol; 3: Article 3.

Spector T. (1978): *Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation*. Anal Biochem; 86(1): 142-146.

Srigley J. R., Delahunt B., Eble J. N., Egevad L., Epstein J. I., Grignon D., Hes O., Moch H., Montironi R., Tickoo S. K., Zhou M., Argani P. (2013): *The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia*. Am J Surg Pathol; 37(10): 1469-1489.

Stenmark H. (2009): *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. Nat Rev Mol Cell Biol; 10(8): 513-525.

Stephenson A. J., Chetner M. P., Rourke K., Gleave M. E., Signaevsky M., Palmer B., Kuan J., Brock G. B., Tanguay S. (2004): *Guidelines for the surveillance of localized renal cell carcinoma based on the patterns of relapse after nephrectomy*. J Urol; 172(1): 58-62.

Stern R., Shuster S., Neudecker B. A., Formby B. (2002): *Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited*. Exp Cell Res; 276(1): 24-31.

Steurer S., Seddiqi A. S., Singer J. M., Bahar A. S., Eichelberg C., Rink M., Dahlem R., Huland H., Sauter G., Simon R., Minner S., Burandt E., Stahl P. R., Schlomm T., Wurlitzer M., Schluter H. (2014): *MALDI imaging on tissue microarrays identifies molecular features associated with renal cell cancer phenotype*. Anticancer Res; 34(5): 2255-2261.

Störkel S., Steart P. V., Drenckhahn D., Thoenes W. (1989): *The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol; 56(4): 237-245.

Szabó Z., Hämäläinen J., Loikkanen I., Moilanen A. M., Hirvikoski P., Väisänen T., Paavonen T. K., Vaarala M. H. (2010): *Sorbitol dehydrogenase expression is regulated by androgens in the human prostate*. Oncol Rep; 23(5): 1233-1239.

Tallini G. (1998): *Oncocytic tumours*. Virchows Arch; 433(1): 5-12.

Taylor C. R., Levenson R. M. (2006): *Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II*. Histopathology; 49(4): 411-424.

Taylor C. R., Rudbeck L. (Hersg.) (2013): *Dako education guide - Immunohistochemical staining methods* (6. Auflage): Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark. 215 Seiten.

Taylor C. R. (2014): *Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice*, in: *Histopathology: methods and protocols*. Day C. E., (Hersg.). New York: Humana Press. Seite 81-109.

Teufel M., Saudek V., Ledig J. P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., Cairns N. J., Carter C., Cowley D. J., Duverger D., Ganzhorn A. J., Guenet C., Heintzelmann B., Laucher V., Sauvage C., Smirnova T. (2003): *Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase*. J Biol Chem; 278(8): 6521-6531.

The ENCODE Project Consortium (2012): *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature; 489(7414): 57-74.

Theis J. D., Dasari S., Vrana J. A., Kurtin P. J., Dogan A. (2013): *Shotgun-proteomics-based clinical testing for diagnosis and classification of amyloidosis*. J Mass Spectrom; 48(10): 1067-1077.

Trpkov K., Grignon D. J., Bonsib S. M., Amin M. B., Billis A., Lopez-Beltran A., Samaratunga H., Tamboli P., Delahunt B., Egevad L., Montironi R., Srigley J. R. (2013): *Handling and staging of renal cell carcinoma: the International Society of Urological Pathology Consensus (ISUP) conference recommendations*. Am J Surg Pathol; 37(10): 1505-1517.

Tsujimoto Y., Tomita Y., Hoshida Y., Kono T., Oka T., Yamamoto S., Nonomura N., Okuyama A., Aozasa K. (2004): *Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer*. Clin Cancer Res; 10(9): 3007-3012.

Tumorregister München (2016): *Überleben ICD-10 C64: Nierenkarzinom* [Internet, aktualisiert am 12.04.2016]. Abrufbar von: http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC64_G-ICD-10-C64-Nierenkarzinom-Survival.pdf.

Tusher V. G., Tibshirani R., Chu G. (2001): *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A; 98(9): 5116-5121.

Uchiyama K., Kondo H. (2005): *p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER*. J Biochem; 137(2): 115-119.

Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B. M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigarto C. A.-K., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J. O., Hober S., Alm T., Edqvist P.-H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J. M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. (2015): *Tissue-based map of the human proteome*. Science; 347(6220).

Unwin R. D., Craven R. A., Harnden P., Hanrahan S., Totty N., Knowles M., Eardley I., Selby P. J., Banks R. E. (2003): *Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect*. Proteomics; 3(8): 1620-1632.

Uzozie A., Nanni P., Staiano T., Grossmann J., Barkow-Oesterreicher S., Shay J. W., Tiwari A., Buffoli F., Laczko E., Marra G. (2014): *Sorbitol dehydrogenase overexpression and other aspects of dysregulated protein expression in human precancerous colorectal neoplasms: a quantitative proteomics study*. Mol Cell Proteomics; 13(5): 1198-1218.

Valera V. A., Li-Ning T. E., Walter B. A., Roberts D. D., Linehan W. M., Merino M. J. (2010): *Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas*. J Cancer; 1: 184-196.

van der Loos C. M. (2008): *Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging*. J Histochem Cytochem; 56(4): 313-328.

Varghese F., Bukhari A. B., Malhotra R., De A. (2014): *IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples*. PLoS One; 9(5): e96801.

Walker R. A. (2006): *Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I*. Histopathology; 49(4): 406-410.

Wang J., Zhao X., Qi J., Yang C., Cheng H., Ren Y., Huang L. (2015): *Eight proteins play critical roles in RCC with bone metastasis via mitochondrial dysfunction*. Clin Exp Metastasis; 32(6): 605-622.

Warburg O. (1956): *On the origin of cancer cells*. Science; 123(3191): 309-314.

Weis S. M., Cheresh D. A. (2011): *AlphaV integrins in angiogenesis and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med; 1(1): a006478.

Weißer J., Lai Z. W., Bronsert P., Kuehs M., Drendel V., Timme S., Kuesters S., Jilg C. A., Wellner U. F., Lassmann S., Werner M., Biniossek M. L., Schilling O. (2015): *Quantitative proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded clear cell renal cell carcinoma tissue using stable isotopic dimethylation of primary amines*. BMC Genomics; 16: 559.

Werner M., Von Wasielewski R., Komminoth P. (1996): *Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry*. Histochem Cell Biol; 105(4): 253-260.

Wettersten H. I., Hakimi A. A., Morin D., Bianchi C., Johnstone M. E., Donohoe D. R., Trott J. F., Aboud O. A., Stirdivant S., Neri B., Wolfert R., Stewart B., Perego R., Hsieh J. J., Weiss R. H. (2015): *Grade-dependent metabolic reprogramming in kidney cancer revealed by combined proteomics and metabolomics analysis*. Cancer Res; 75(12): 2541-2552.

White E. (2013): *Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers*. Genes Dev; 27(19): 2065-2071.

White N. M., Masui O., Desouza L. V., Krakovska O., Metias S., Romaschin A. D., Honey R. J., Stewart R., Pace K., Lee J., Jewett M. A., Bjarnason G. A., Siu K. W., Yousef G. M. (2014): *Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma*. Oncotarget; 5(2): 506-518.

Wise L. N., Bryan J. N., Sellon D. C., Hines M. T., Ramsay J., Seino K. K. (2009): *A retrospective analysis of renal carcinoma in the horse*. J Vet Intern Med; 23(4): 913-918.

Wittekind C., Meyer H.-J. (Hersg.) (2010): *TNM Klassifikation maligner Tumoren* (7. Auflage). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland. 295 Seiten.

Xia D., Tang W. K., Ye Y. (2016): *Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p*. Gene; 583(1): 64-77.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Takiguchi S., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Nakamori S., Sakon M., Monden M., Aozasa K. (2003a): *Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma*. J Clin Oncol; 21(13): 2537-2544.

Yamamoto S., Tomita Y., Nakamori S., Hoshida Y., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., Monden M., Aozasa K. (2003b): *Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence*. J Clin Oncol; 21(3): 447-452.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Iizuka N., Kidogami S., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Nakamori S., Sakon M., Monden M., Aozasa K. (2004a): *Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma*. Clin Cancer Res; 10(16): 5558-5565.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., Ishikawa O., Ohigashi H., Nakamori S., Monden M., Aozasa K. (2004b): *Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol; 11(2): 165-172.

Yamamoto S., Tomita Y., Nakamori S., Hoshida Y., Iizuka N., Okami J., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., Ishikawa O., Ohigashi H., Aozasa K., Monden M. (2004c): *Valosin-containing protein (p97) and Ki-67 expression is a useful marker in detecting malignant behavior of pancreatic endocrine neoplasms*. Oncology; 66(6): 468-475.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Toyosawa S., Inohara H., Kishino M., Kogo M., Nakazawa M., Murakami S., Iizuka N., Kidogami S., Monden M., Kubo T., Ijuhin N., Aozasa K. (2004d): *Expression level of valosin-containing protein (VCP) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma*. Ann Oncol; 15(9): 1432-1438.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Iizuka N., Monden M., Yamamoto S., Iuchi K., Aozasa K. (2004e): *Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma*. Ann Surg Oncol; 11(7): 697-704.

Yamamoto S., Tomita Y., Hoshida Y., Sakon M., Kameyama M., Imaoka S., Sekimoto M., Nakamori S., Monden M., Aozasa K. (2004f): *Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis*. Clin Cancer Res; 10(2): 651-657.

Yamamoto S., Tomita Y., Uruno T., Hoshida Y., Qiu Y., Iizuka N., Nakamichi I., Miyauchi A., Aozasa K. (2005): *Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer*. Ann Surg Oncol; 12(11): 925-934.

Yang T., Chen F., Xu F., Wang F., Xu Q., Chen Y. (2014): *A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted proteomics assay for monitoring P-glycoprotein levels in human breast tissue*. Clin Chim Acta; 436: 283-289.

Yusenko M. V., Ruppert T., Kovacs G. (2010): *Analysis of differentially expressed mitochondrial proteins in chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas by 2-D gel electrophoresis*. Int J Biol Sci; 6(3): 213-224.

Zhao Z., Wu F., Ding S., Sun L., Liu Z., Ding K., Lu J. (2015): *Label-free quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers and pathways in renal cell carcinoma*. Tumour Biol; 36(2): 939-951.

Zhou W., Liotta L. A., Petricoin E. F. (2015): *Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics*. Cancer Lett; 356(2 Pt A): 176-183.

Zopf S., Flämig J., Schmid H., Miosge N., Blaschke S., Hahn E. G., Müller G. A., Grunewald R. W. (2009): *Localization of the polyol pathway in the human kidney*. Histol Histopathol; 24(4): 447-455.

IX ANHANG

1 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte

1.1 Bei der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Tabelle IX-1. Bei der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse verwendete Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
96-Wellplatte	Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorfgefäß, 1,5/2 ml	Safe-Lock Tubes 1,5/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäß, low-bind	Protein LoBind Tubes 1,5/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kationenaustauscher-Scheiben für StageTips	Empore Solid Phase Extraction Disc Cation-SR, Model 2251	3M Center, St. Paul, USA
Objektträger	Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Octadecylsilan-Scheiben für StageTips	Empore Solid Phase Extraction Disc, Model 2215 - C18 (Octadecyl)	3M Center, St. Paul, USA
pH-Papier	pH-Indikatorstäbchen pH 0-6,0 / 5,0-10,0	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Pipettenspitzen, 0,1-10 / 2-200 / 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß, 2 ml	SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Sep-Pak-Säulchen	Sep-Pak Vac 1cc (50 mg) C18 cartridges	Waters Corporation, Milford, USA
Skalpell	Disposable scalpel-Standard No. 11	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
viereckige Petrischale	Petrischale, quadratisch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Cellstar Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle IX-2. Bei der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse verwendete Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Aceton Chromasolv Plus for HPLC ≥99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acetonitril	Acetonitril Chromasolv Plus for HPLC ≥99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid, 30 %	Acrylamid 4K-Solution (30 %) Mix 37,5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Ammoniumacetat ≥99,0 % for mass spectrometry	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

<i>Reagenz</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Ammoniumpersulfat	Ammoniumpersulfat ≥98 % for molecular biology, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bicinchoninsäuretest Reagenz Lösung A	BCA Reagent A Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bicinchoninsäuretest Reagenz Lösung B	BCA Reagent B Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
bovines Serumalbumin	Albumin Standard Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bradford-Reagenz (Stammlösung)	Bradford-Solution for Protein Determination	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromophenol Blau	PlusOne Bromophenol Blue	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Dithiothreitol	DTT für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Essigsäure ≥99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Ethanol ≥99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd (Silbernitratfärbung)	Formaldehydlösung >37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd leicht	Formaldehyde solution 37 wt. % in H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd medium	Formaldehyde (D ₂ , 98 %), (~20 % w/w in D ₂ O)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA
Formaldehyd schwer	Formaldehyde (20 % w/w in D ₂ O), (13C, 99 %; D ₂ , 98 %)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA
Glycerol	PlusOne Glycerol	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Glycin	Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	HEPES für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Iodacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid ACS reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat	Kaliumhexacyanoferrat	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Marker	Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Methanol	Methanol ChromasolV for HPLC ≥99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcarbonat	Natriumcarbonat ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcyanobordeuterid	Sodium cyanoborodeuteride (D ₃ , 98 %) 95 %+ chemical purity	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA

<i>Reagenz</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Natriumcyanoborhydrid	Natriumcyanoborhydrid-Lösung 5,0 M in 1 M NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Natriumdodecylsulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumthiosulfat	Natriumthiosulfat Reagent Plus 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natronlauge	Natronlauge 2 mol/l	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure	Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Salzsäure 2 mol/l	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine ~99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trifluoressigsäure	Trifluoressigsäure ≥99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Trypsin, modified, sequence grade	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA

Tabelle IX-3. Bei der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Fraktionensammler	Fraction collector Frac-100	Amersham Pharmacia Biotech AB, jetzt Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Gelelektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gießsystem	Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Glasspritze	Gastight Model 1002 TLL	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock	Thermoshaker TS1	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
HPLC	L-6200 intelligent pump L-4000A UV-Detector LC-Organizer	Merck-Hitachi, Tokyo, Japan
Inkubator	Trocken- und Wärmeschrank FD 53	Fa. BINDER GmbH, Tüfingen, Deutschland
Kreisschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Pipetten, 0,5-10 / 2-20 / 10-100 / 20-200 / 100-1000 µl	Eppendorf Research plus, Ein-kanal, variabel	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipettierhilfe für Sep-Pak-Säulchen	pi-pump bis 25 ml	Glasfibr Giessen, Gießen, Deutschland

<i>Gerät</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Schüttler	Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Spannungsgerät	PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
stumpfe Kanüle und passender Kolben für StageTips	Needle Kel-F hub (KF), point style 3, gauge 16; Plunger assembly N, RN, LT, LTN for model 1702 (25µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Tischzentrifuge	Corning LSE Mini Microcentri- fuge	Corning Incorporated, Corning, USA
Tischzentrifuge	Mirkozentrifuge, MiniStar silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic 310/H	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
UV-Spektrometer	SpectraMax 340PC384 Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Waage	Sartorius Basic plus Präzisionswaage BP221S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Inkubations-/ Inaktivierungsbad 1013	GFL Gesellschaft für Labor- technik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge für Reaktionsgefäße	Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für Zentrifugenröhr- chen	Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

1.2 Bei der Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten

Tabelle IX-4. Bei der Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten verwendete Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Eindeckfolie, HE	Cover Glass, Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Eindeckfolie, IHC	Tissue-Tek SCA Coverslipping Film	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufeu Deutschland
Mikrotomklingen	microtome blades S-35	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Objektträger für HE-Färbungen	Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Objektträger für IHC	Adhäsions-Objektträger SuperFrost plus	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 0,5-20 / 1-200 / 100-1200 µl	ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipette	Costar 5/10/25 ml Stripette Serological Pipets	Corning Incorporated, Corning, USA
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Safe Seal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß, 15 ml	Röhre mit Verschluss, 76x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Cellstar Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Cellstar Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle IX-5. Bei der Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten verwendete Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Antigendemaskierungslösung pH 6,1, Dampfger (zehnfach konzentriert)	Target Retrieval Solution (modifizierter Citratpuffer, pH 6,1)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Antigendemaskierungslösung pH 6,1, PT Link-Modul (fünzfach konzentriert)	Target Retrieval Solution, Low pH (Citratpuffer, pH 6,1)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Antigendemaskierungslösung pH 9,0, Dampfger (zehnfach konzentriert)	Target Retrieval Solution, pH 9 (Tromethamin-Ethylendiamintetraacetat-Puffer, pH 9,0)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Antigendemaskierungslösung pH 9,0, PT Link-Modul (fünzfach konzentriert)	Target Retrieval Solution, High pH (Tromethamin-Ethylendiamintetraacetat-Puffer, pH 9,0)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Bluing-Puffer, Dako	Bluing Buffer, Dako gebrauchsfertig für CoverStainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Citronensäure-Monohydrat	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<i>Reagenz</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
DAB+ Chromogen	EnVision FLEX DAB+ Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Eindeckmedium, Dako	Mounting Medium gebrauchsfertig für CoverStainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
EnVision FLEX/HRP	EnVision FLEX/HRP (Peroxidase-Sekundärantikörper-Dextran-Polymer in gepufferter Lösung mit Stabilisierungsprotein und Konservierungsmittel)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Eosin, Dako	Eosin, Dako gebrauchsfertig für CoverStainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanol	99 % Ethanol, vollständig vergällt mit MEK	SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Hämalaun	Hämalaun-Lösung, sauer, Mayer	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Hämatoxylin, Dako	Hämatoxylin, Dako gebrauchsfertig für CoverStainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mouse LINKER	EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (gepufferte Lösung mit Stabilisierungsprotein und antimikrobieller Substanz)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Natronlauge	Natronlauge 2 mol/l	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Peroxidase-Blocking Reagent	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (wasserstoffperoxidhaltiger Phosphatpuffer mit 15 mM Natriumazid und Detergenz)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Proteinblock	Protein Block Serum-Free (0,25 % Casein in phosphatgepufferter Salzlösung mit Stabilisierungsprotein und 15 mM Natriumazid)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Rabbit LINKER	EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (gepufferte Lösung mit Stabilisierungsprotein und antimikrobieller Substanz)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Substrat	EnVision FLEX Substrate Buffer (gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Verdünnungspuffer	Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Waschpuffer (zehnfach konzentriert)	Wash Buffer 10x (Tromethamin-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20, pH 7,6)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Xylol	Xylol	SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland

Tabelle IX-6. Bei der Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Autostainer	Dako Autostainer Plus	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Coverstainer	Dako CoverStainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Dampfgarer	Dampfgarer, Type 3216 FS20	Braun, De'Longhi Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Dampfkochtopf	Sicomatic-2,5 ltr/0,9 bar	Silit, Riedlingen, Deutschland
Eindeckautomat	Tissue Tek SCA Eindeckauto- mat	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen Deutschland
Heizplatte	Induktionsherd, Type: C30	cookmax, Bartscher GmbH, Salzkotten, Deutschland
Inkubator	Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kühlplatte	Leica EG1150 C Kühlplatte	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Linearfärbeautomat	Tissue stainer, Continuous Linear Stainer COT 20	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Leica DM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	Leica Biosystems RM2255 Mo- torisches Hochleistungsmikro- tom	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Objektive 2,5x/5x/10x/20x/40x	Leica Achromate N-Plan- Objektive	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter	HI-2221 Calibration Check pH Bench Meter	Hanna Instruments Ltd Eden Way, Bedfordshire, England
Pipetten, 0,1-2,5 / 0,5-10 / 10-100 / 20-200 / 100-1000 µl	Eppendorf Research plus, Ein- kanal, variabel	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus, Akku-betriebene Pi- pettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
PT Link-Modul	PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Schnittescanner	Pannoramic SCAN	3D HISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Streckbad	pfm Waterbath 1000	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Tischzentrifuge	Spectrafuge Mini Laboratory Centrifuges (C1301-B)	Labnet International, Inc., Edison, USA
Waage	Sartorius Basic plus Präzisionswaage BP310S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasservollentsalzer	Nowadest Mischbett- Ionenaustauscher, 2800 ND	KSN Wassertechnik Harald Koch, Nistertal, Deutschland

2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Citratpuffer:	10 mM	Citronensäure-Monohydrat Natronlauge zum Einstellen des pH-Wertes in destilliertem Wasser bei pH 6,0
HPLC-Puffer A:	5 mM 25 %	Kaliumdihydrogenphosphat Acetonitril Phosphorsäure zum Einstellen des pH-Wertes in destilliertem Wasser bei pH 2,7
HPLC-Puffer B:	5 mM 500 mM 25 %	Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumchlorid Acetonitril Phosphorsäure zum Einstellen des pH-Wertes in destilliertem Wasser bei pH 2,7
Ladepuffer:	250 mM 10 % (m/V) 30 % (m/V) geringe Menge 10 mM	TRIS Natriumdodecylsulfat Glycerol Bromophenol Blau Dithiothreitol in destilliertem Wasser, pH 6,8
Laufpuffer:	25 mM 250 mM 0,5 % (m/V)	TRIS Glycin Natriumdodecylsulfat in destilliertem Wasser
Lysepuffer:	100 mM 4 % (m/V) 50 mM	HEPES pH 7,5 Natriumdodecylsulfat Dithiothreitol in destilliertem Wasser

3 Herstellung der 12,5-prozentigen Polyacrylamidgele

Zur Herstellung der 12,5-prozentigen Polyacrylamidgele wurde das Gießsystem von Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland genutzt. Die fertigen Gele waren 1,5 mm dick und 9 cm x 6 cm groß. Der Auftrennung der Proteine diene ein Trenngel mit 12,5 % Acrylamid. Dieses wurde zuerst gegossen und setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel:	3,1 ml	30 % Acrylamid
	2 ml	1,5 M TRIS mit 0,3 % (m/V) Natriumdodecylsulfat bei pH 8,8
	2,3 ml	destilliertes Wasser
	36 µl	10 % Ammoniumpersulfat
	5 µl	Tetramethylethylendiamin

Nach erfolgter Polymerisation wurde auf das Trenngel ein Sammelgel mit 6 % Acrylamid gegossen. Um eine Trennung der später, für die Gelelektrophorese, aufgetragenen Proben zu gewährleisten, kam ein Kamm zur Erzeugung von zehn Taschen zum Einsatz.

Sammelgel:	1 ml	30 % Acrylamid
	630 µl	1,5 M TRIS mit 0,3 % (m/V) Natriumdodecylsulfat bei pH 8,8
	3,3 ml	destilliertes Wasser
	25 µl	10 % Ammoniumpersulfat
	5 µl	Tetramethylethyldiamin

4 Zusammensetzung der Reagenzien für die Silbernitratfärbung

Fixationspuffer:	40 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
		in destilliertem Wasser
Yellow Mix:	38 %	Kaliumhexacyanoferrat
	62 %	Natriumthiosulfat
		von dieser Mischung eine geringe Menge in destilliertem Wasser gelöst
Silbernitrat:	11,7 mM	Silbernitrat in destilliertem Wasser
Natriumcarbonat:	2,9 % (m/V)	Natriumcarbonat in destilliertem Wasser
Essigsäure:	5 %	Essigsäure in destilliertem Wasser

5 Zusammensetzung der Lösungen für die Fraktionierung mittels StageTips

Austauscher-Ladepuffer:		
	0,5 %	Essigsäure
	20 %	Acetonitril
		in destilliertem Wasser
1 M Ammoniumacetatlösung:		
	0,5 %	Essigsäure
	20 %	Acetonitril
	1 M	Ammoniumacetat
		in destilliertem Wasser

Die 20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM und 500 mM Ammoniumacetatlösungen wurden durch Verdünnen der 1 M Ammoniumacetatlösung mit Austauscher-Ladepuffer hergestellt:

	0,5 %	Essigsäure
	20 %	Acetonitril
	entsprechend	Ammoniumacetat
		in destilliertem Wasser

6 Protokoll für den Coverstainer

Tabelle IX-7. Protokoll für die HE-Färbung mittels Coverstainer

<i>Schritt/Behälter</i>	<i>Reagenz</i>	<i>Inkubationszeit [min:sec]</i>
1	Xylol	3:00
2	Xylol	3:00
3	96 % Ethanol	0:10
4	96 % Ethanol	2:00
5	70 % Ethanol	2:00
6	Leitungswasser	1:00
7	Hämatoxylin, Dako	5:00
8	destilliertes Wasser	1:00
9	Bluing-Puffer, Dako	1:00
10	Leitungswasser	1:00
11	70 % Ethanol	1:00
12	Eosin, Dako	3:30
13	96 % Ethanol	1:00
14	99 % Ethanol	1:00
15	99 % Ethanol	1:00
16	99 % Ethanol	1:00
17	Xylol	1:00

X DANKSAGUNG

Für die Betreuung dieser Dissertation und die Annahme als Doktorandin an der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich herzlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. vet. med. Walter Hermanns. Die Kommunikation war stets sehr angenehm.

Ein besonderer Dank ergeht an Herrn Prof. Dr. med. Martin Werner, der die Bedingungen zur Durchführung dieser Dissertation an seinem Institut geschaffen hat, für die stets freundliche Unterstützung und konstruktiven Gespräche.

Frau Dr. Vanessa Drendel danke ich für die initiale Idee zu dem gewählten Thema, ihre Betreuung und ihre kompetente Unterstützung insbesondere bei der Beurteilung und Auswahl der Fälle sowie der Etablierung der immunhistochemischen Färbungen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Oliver Schilling für die Betreuung des proteomischen Teils dieser Dissertation und die Bereitstellung der massenspektrometrischen Analysen durch Martin Biniossek. Obwohl ich kein offizielles Mitglied seiner Arbeitsgruppe war, habe ich mich bei ihm stets willkommen gefühlt und er hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen.

Für die Aufarbeitung des klinischen Hintergrunds zu den ausgewählten Patienten und die Beiträge zu unseren Diskussionen aus klinischer Sicht danke ich Dr. Cordula Jilg und Dr. Andrea Gühna.

Herzlich danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg für die unvergessliche Zeit in diesem Institut. Dabei ergeht mein besonderer Dank an Markus Kühs, Bettina Herde, Julia Huber und Nicola Bittermann für die Einweisung, ihre Unterstützung und ihren erfahrenen Rat im Labor. Manfred Kopp danke ich für die stets schnelle Hilfe bei allen Problemen rund um den Computer. Theresa Ahrens, Britta Weddeling und allen anderen aus dem zweiten und dritten Stock danke ich für das sehr nette Arbeitsklima und die erholsamen Mittagspausen.

Bei Melanie Föll, Dr. Stefan Tholen, Florian Sigloch, Bettina Mayer, Ann-Kathrin Müller und der gesamten AG Schilling bedanke ich mich sehr herzlich für die sehr freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Einarbeitung und große Hilfsbereitschaft sowie für die inspirierenden Gespräche und Diskussionen.

Ein großer Dank geht an meinen Mann Stefan, dessen Liebe, Unterstützung und aufmunternder Zuspruch mindestens genauso wichtig für das Gelingen dieser Arbeit waren, wie seine Erfahrungen beim wissenschaftlichen Arbeiten. Meinen Eltern und Geschwistern danke ich dafür, dass sie mir stets den nötigen Rückhalt gegeben und meiner Arbeit in der Ferne das nötige Verständnis entgegen gebracht haben.